

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：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19560

研究課題名(和文) α v β 3 integrin による造血幹細胞活性の双方向的な制御研究課題名(英文) α v β 3 integrin bidirectionally regulates hematopoietic stem cells

研究代表者

梅本 晃正 (Umemoto, Terumasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任助教

研究者番号：50620225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は造血システムにおいて、最も中心的な役割を果たしていることが知られているが、未だ不明な点が多い。本研究は接着分子である α v β 3 integrin が「双方向的に造血幹細胞活性を制御する機構の分子メカニズムの解明」を目的として行われ、 α v β 3 integrin は外部から誘導される刺激に依存して、造血幹細胞活性を制御することを見出した。このように、本研究で得られた成果は細胞接着を介した新しい造血幹細胞の制御機構を明らかにすると共に、体外での造血幹細胞の維持・増殖のための新規基盤技術の構築や、慢性炎症によって引き起こされる骨髄抑制や貧血などの造血器疾患の機序の解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic homeostasis depends on the maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs), which are regulated within a specialized bone marrow (BM) niche. Integrin α v β 3 signaling maintains HSCs within the niche. Here, we showed the synergistic negative regulation of the pro-inflammatory cytokine interferon- γ (IFN γ) and α v β 3 integrin signaling in HSC function by a novel definitive phenotyping of HSCs. Integrin α v β 3 suppressed HSC function in the presence of IFN γ , and impaired integrin α v β 3 signaling mitigated IFN γ -dependent negative action on HSCs. During IFN γ stimulation, integrin α v β 3 signaling enhanced STAT1-mediated gene expression via serine phosphorylation. These findings show that integrin α v β 3 signaling intensifies the suppressive effect of IFN γ on HSCs, which indicates that cell adhesion via integrin α v β 3 within the BM niche acts as a context-dependent signal modulator to regulate the HSC function under both steady state and inflammatory conditions.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 サイトカインシグナル インテグリン

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自らと同等の細胞を産生できる「自己複製能」と全血球系細胞に分化可能な「多分化能」を併せ持つ体性幹細胞で、これらの能力を駆使することによって、造血システムにおいて最も中心的な役割を果たしている。一方、インテグリン受容体は接着分子として最も有名なファミリーの一つとして知られており、 $\alpha 4 \beta 1$ integrin、 $\alpha 5 \beta 1$ integrin、 $\alpha 9 \beta 1$ integrin 等の $\beta 1$ integrin ファミリーが造血幹細胞のホーミング、増殖、分化等の制御等に関与することが古くから報告されているが、 $\alpha v \beta 3$ integrin に関しては造血幹細胞では殆ど注目されておらず、その役割も知られていなかった。そのような状況下で我々は、造血幹細胞において integrin $\beta 3$ の発現が高いこと、 $\alpha v \beta 3$ integrin の発現と幹細胞活性が相関することを示し、世界に先駆けて造血幹細胞と $\alpha v \beta 3$ integrin との関連性について報告した (Umemoto et al., *J Immunol*, 2006 他)。また、我々は最近、 $\alpha v \beta 3$ integrin が造血幹細胞活性の維持に必須であること、 $\alpha v \beta 3$ integrin を介した幹細胞活性維持には「Thrombopoietin (TPO)」が必須であること、「 $\alpha v \beta 3$ integrin の Tyr-747 のリン酸化を介した outside-in signaling」が TPO 依存性の造血幹細胞活性維持の促進に寄与すること等を明らかにし、 $\alpha v \beta 3$ integrin による造血幹細胞活性維持の分子メカニズムを証明した (図 A, B; Umemoto et al., *Blood*, 2012)。さらに、TPO を含有する適切な条件下で $\alpha v \beta 3$ integrin を介したシグナルを誘導することによって、*in vitro* でも造血幹細胞の能力を減弱させることなく、数日間維持することにも成功している (Umemoto et al., *Blood*, 2012)。一方、我々は直近の研究成果では、上記の TPO 含有造血幹細胞維持培養条件下であっても、造血幹細胞活性抑制因子として

知られている Interferon- γ (IFN γ) が共存すると、 $\alpha v \beta 3$ integrin を介したシグナルは逆に造血幹細胞活性を負に抑制することを新たに見出している (図 C; Ishihara, Umemoto et al., *Int J Hematol*, 2014)。以上のように、我々は $\alpha v \beta 3$ integrin を介した造血幹細胞の活性維持機構の分子メカニズム、及び $\alpha v \beta 3$ integrin シグナルとサイトカインシグナルとのクロストーク等を見出し、「 **$\alpha v \beta 3$ integrin は培養条件 (周辺環境) に応じて幹細胞活性を双方向的に制御する**」ことを示してきた。これまで造血幹細胞に関連にするインテグリンの研究は $\beta 1$ integrin ファミリーを中心に展開されてきたが、 $\alpha v \beta 3$ integrin に関する我々のこれまで研究成果は、このフィールドに新しい展開をもたらすものとしても、現在注目を集めている。

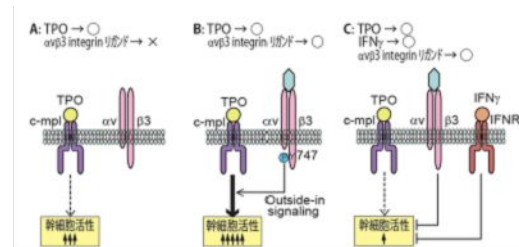


図: $\alpha v \beta 3$ integrin を介した造血幹細胞活性の双方向的制御

2. 研究の目的

$\alpha v \beta 3$ integrin を介した双方向的な造血幹細胞活性制御機構において、その方向性を決定するメカニズムに関しては未だ不明である。本研究では、IFN γ 存在下で観察される $\alpha v \beta 3$ integrin を介したシグナルが及ぼす造血幹細胞活性抑制のメカニズムに焦点を当て、 $\alpha v \beta 3$ integrin による造血幹細胞活性制御の方向を決定する分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

最初に、「 $\alpha v \beta 3$ integrin による造血幹細胞活性制御」において、IFN γ の下流分子である「STAT1」の関与を検討するために、STAT1

欠損マウスより造血幹細胞を分取し、IFN とビトロネクチン (α 3 integrin のリガンド) の共存在下で培養した後、移植実験を行った。また、「 α 3 integrin の幹細胞活性維持効果を誘導する TPO」と IFN が STAT1 の活性化に及ぼす影響をフローサイトメーターにて比較した。さらに、IFN 存在下でビトロネクチンが STAT1 のリン酸化状態や STAT1 を介した遺伝子発現に与える影響を、フローサイトメーターや次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq を用いて検討した。

4. 研究成果

IFN は野生型造血幹細胞の細胞増殖の抑制し、移植後の生着にも負の影響を及ぼす。一方で、STAT1 欠損マウス由来造血幹細胞では、IFN 処理により細胞増殖が促進され、移植後の生着も向上した。一方、TPO と IFN

が STAT1 のチロシンリン酸化に与える影響を検討したところ、IFN はチロシンリン酸化を持続的に誘導するが、TPO は一時的であった。さらに、IFN 存在下でビトロネクチンは STAT1 のセリンリン酸化や STAT1 を介した遺伝子発現を更新していた。重要なことに、

α 3 integrin シグナルの障害は in vivo の造血幹細胞における IFN の応答を著しく阻害した。これらより、 α 3 integrin の造血幹に対する影響は STAT1 の活性化状態に依存していることが示唆された。

これらから、IFN は野生型造血幹細胞と STAT1 欠損マウス由来造血幹細胞に与える影響が異なり、さらに、 α 3 integrin を介したシグナルはそれぞれで観察された影響を促進しているように見えた。ちなみに、IFN

は STAT1 の持続的な活性化を誘導することによって STAT1 の影響を優位にさせていた。従って、 α 3 integrin が造血幹細胞に与える影響の方向性は造血幹細胞の周辺環境に依存的であり、 α 3 integrin は周辺環境からのシグナルを増幅するシグナルブースターとして造血幹細胞の機能の制御に寄

与していることが示された。

このように、本研究では α 3 integrin が造血幹細胞における IFN の応答において、重要な役割を果たしていることが示された。従って、本研究の成果は、再生不良性貧血等の IFN がメディエーターとなって誘導される造血器疾患の治療法の開発において、新たな指針をもたらす可能性があると考えられる。一方、我々は以前に、 α 3 integrin は in vitro における造血幹細胞の維持に寄与することを示している。これに加え、本研究の成果を考慮すると、「 α 3 integrin を介したシグナルの誘導」と「STAT1 の阻害」の併用によって、より安定的な in vitro での造血幹細胞維持・増幅に寄与することが期待されるため、本研究の成果は対外での造血幹細胞維持・増幅のための基盤技術の開発にも寄与する可能性も十分考えられる。

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 1 件)

Terumasa Umemoto, Yu Matsuzaki, Yoshiko Shiratsuchi, Michihiro Hashimoto, Takayuki Yoshimoto, Ayako Nakamura-Ishizu, Brian Petrich, Masayuki Yamato and Toshio Suda., Integrin α 3 enhances the suppressive effect of interferon- on hematopoietic stem cells. *EMBO J.*, in press

[学会発表](計 5 件)

梅本晃正、松崎優、大和雅之、古澤純一、善本隆之、須田年生、integrin α 3 による双方向的な造血幹細胞活性の制御、BMB2015、2015年12月1日~12月4日、神戸

Tereumsa Umemoto, Yu Matsuzaki, Junichi Furusawa, Takayuki Yoshimoto, Masayuki Yamato, Toshio Suda,

Integrin α 3 exerts double-edged effects on hematopoietic stem cells in response to STAT1 status, Singapore-Japan joint symposium, Jan 14-16th 2016, Singapore

Terumasa Umemoto, Yu matsuzaki, Junichi Furusawa, Takayuki Yoshimoto, Masayuki Yamato, Toshio Suda, Integrin α 3 regulates long-term repopulating activity of hematopoietic stem cells through the double-edged influences., 第15回幹細胞シンポジウム, 2016年5月20日~5月21日、淡路島

梅本 晃正、周辺環境に依存する Integrin α 3 による造血幹細胞活性の制御、平成28年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】」若手支援技術講習会、2016年9月14日~9月17日、蓼科
Terumasa Umemoto, Yu matsuzaki, Junichi Furusawa, Takayuki Yoshimoto, Masayuki Yamato, Toshio Suda, Integrin α 3 regulates long-term repopulating activity of hematopoietic stem cells through the double-edged influences., 2nd Kumamoto IRCMS international symposium and 17th Kumamoto AIDA seminar, Oct 30th-Nov 2nd 2016, Kumamoto

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅本 晃正 (Umemoto, Terumasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任助教

研究者番号: 50620225