

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02845

研究課題名(和文)造血幹細胞ニッチ因子としての代謝物の時空間構成と機能解明

研究課題名(英文)Composition and function of metabolites as hematopoietic stem cell niche factors

研究代表者

田久保 圭誉 (Takubo, Keiyo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・生体恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類成体の血液細胞が産生される骨髄にはニッチと呼ばれる微小環境が存在しており、組織幹細胞の一種である造血幹細胞がそこに存在する。ニッチは造血幹細胞の機能や数、運命を制御する因子を造血幹細胞に供給する。本研究では、造血幹細胞に作用するニッチの要素として骨髄に存在する代謝物に着目し、その構成や分布、造血幹細胞への効果を検証した。特にアルブミンに結合した脂肪酸が造血幹細胞の維持に必要であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄の造血幹細胞ニッチで作動している分子機構の解明は、われわれの全細胞の半分以上を占める血液細胞の産生機構を解き明かす。さらに造血器腫瘍、あるいは血液細胞が関わる様々な疾患の病態の理解と治療法開発に寄与すると考えられる。また、体外で代謝物も含めてニッチ環境を再現することで、造血幹細胞の培養や増幅が可能になり、血液疾患病態の再現や、再生医療に利用可能な細胞ソースの供給にも貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：In adult mammals, blood cells are produced in the bone marrow. The bone marrow contains a microenvironment called the "niche" in which hematopoietic stem cells (HSCs), a type of tissue stem cell, reside. The niche provides HSCs with factors that control their function, number, and fate. In this study, we focused on metabolites present in bone marrow as elements of the niche that act on HSCs, and investigated their composition, distribution, and effects on HSCs. In particular, we found that fatty acids bound to albumin are required for the maintenance of HSCs.

研究分野：幹細胞生物学、血液学

キーワード：造血幹細胞 幹細胞ニッチ 骨髄 イメージング メタボロミクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全ての血液細胞を生み出す機能を有する造血幹細胞は、哺乳類の成体においては骨の中・骨髄の微小環境(ニッチ)に局在しており、未分化性を維持しながら適切なタイミングで分裂・分化することで必要に応じた血液細胞を供給する。骨髄で造血幹細胞近傍にいるニッチ細胞は、サイトカインやケモカインなどのニッチ因子を造血幹細胞へと供給する。造血幹細胞はこれらのニッチ因子を受容して、自身の幹細胞性を維持しながら、自己複製や分化などの細胞運命を辿り、全身の造血需要に応じて分化した血液細胞を産生する。骨髄の細胞外の pO<sub>2</sub> は約 10-20mmHg で、全臓器の中でも低酸素環境とされている。こうした低酸素環境もニッチ因子として造血幹細胞の機能と数を維持するために貢献する。これらの骨髄の造血幹細胞ニッチで作動している分子機構の解明は、基礎生物学的な興味を越えて、造血器腫瘍、あるいは血液細胞が関わる様々な疾患の病態の理解と治療法開発に寄与すると考えられている。また、体外でニッチ環境を再現することで、造血幹細胞の増幅が可能になり、再生医療への貢献も期待されている。これまでに研究代表者は造血幹細胞ニッチの研究分野において、ニッチ細胞として巨核球を同定し(J Exp Med 2015)、またニッチ因子としての低酸素環境の重要性と、機能的な意義について明らかにしてきた(Cell Stem Cell 2010, 2013)。さらに病態や疾患におけるニッチの変化とその分子機構も明らかにしている(Blood 2014, Cell Rep 2015 他)。近年では造血幹細胞が細胞内で特有の代謝物の特徴「代謝プログラム」を保持することが幹細胞性の発揮に不可欠であることを見出した(Cell Stem Cell 2013, 2016)。しかし、骨髄の細胞外環境で種々の代謝物がいかなる分布を示し、造血幹細胞に対してどのような作用を発揮するかは不明で、これを実験的に検証する機運が高まっている状況であった。

### 2. 研究の目的

これまで造血幹細胞を制御するニッチ因子の研究が数多くなされてきた。その結果、種々のサイトカイン等のタンパク質や酸素分圧が、造血幹細胞の機能や数を制御する重要なニッチ因子であることが明らかとなった。ニッチ因子は造血幹細胞内の代謝物の構成を変化させる代謝プログラムを起動して、造血幹細胞の「幹細胞性」、細胞周期の静止期性や自己複製能、多分化能などを制御していることが研究代表者らの研究によって知られるようになってきている。しかしながら、ニッチの細胞外における代謝物の構成や分布と、造血幹細胞をはじめとする血液細胞へと及ぼす影響はいまだ不明である。本研究では、マウス骨髄の代謝物の構成と分布を明らかにし、造血幹細胞ニッチ因子としての機能と作動機構の解明を目的とした研究を3年度にわたって実施した。

### 3. 研究の方法

本研究では各種質量分析技術やイメージング、単一細胞解析技術を動員して、3年度かけて造血幹細胞ニッチに分布する代謝物の特徴と変化を解明し、それらが造血幹細胞に及ぼす影響を解き明かすこととした。具体的な方法論は下記の通りである：

#### (i) 骨髄の代謝物構成の同定：

骨髄は含有栄養素が豊富な組織であると考えられているが、実際にどのような代謝物を多く含むかは不明である。本研究では、代謝物プロファイリングをマウス骨髄で実施して、骨髄中に含まれる代謝物を同定することとした。一般的なメタボローム解析では、中心炭素代謝をはじめとする水溶性の極性分子の同定に長けている CE-MS(キャピラリー電気泳動質量分析計)による解析が多く、研究代表者も既に予備検討で単離した血液細胞が含有する多くの代謝物を見出している。しかし、CE-MS では未知分子同定は不得意であること、造血幹細胞のストレス応答に必要と考えられている脂質メディエーターの同定は困難であることが知られている。そこで、本研究では CE-MS に加えて未知代謝物同定に長けている CE-TOFMS 解析と、脂質の同定に長けた LC-MS(液体クロマトグラフ質量分析計)によるメタボローム解析も実施した。

#### (ii) 造血幹細胞ニッチに分布する代謝物の同定：

骨髄の代謝物分布も一様ではないことが想定されるが、詳細は不明である。そこで本研究では骨髄の代謝物分布を各種代謝物イメージングや、骨髄の in vivo イメージングを用いて検討を行った。

#### (iii) ニッチに存在する代謝物が造血幹細胞に作用するメカニズムの検証：

以上の検討で同定された代謝物が造血幹細胞に及ぼす作用と意義を明らかにする。造血幹細胞培養で代謝物の添加による造血幹細胞の増殖・維持・幹細胞機能への影響を検証する。また、(i)、(ii)の探索の成果と別に、造血幹細胞やニッチ細胞が放出しうる代謝物が造血幹細胞機能に果たす役割も同様に検証することとした。

#### 4. 研究成果

初年度は、技術的最適化を行いながら骨髄の代謝物構成の実験検討を実施した。動物の骨髄は食材にも利用されるほど含有している栄養素が豊富な組織であるとされているが、実際にどのような代謝物を多く含むかは不明であった。そこで、メタボローム解析をマウス骨髄で実施して、骨髄中に含まれる代謝物の網羅的な同定を行うべく実験を実施した。また、本解析と並行して、メタボローム解析に資する骨髄からの代謝物回収法の改善も行い、既存の骨髄フラッシュアウト法による骨髄の回収法以外のさまざまな方法を検討し、技術的に最適化することで確実な骨髄代謝物プロファイルを得ることができた。

第二年度は、前年度までの骨髄内部の代謝物構成の検討を継続しながら、骨髄の各種イメージング技法を用いて骨髄内の代謝物の分布を時空間的に明らかにするための検討を時空間的に行った。特に脂肪酸の重要性に関しての解析を実施して、脂肪酸結合結合アルブミンが循環血中から類洞血管を經由して骨髄腔中に拡散していることを見出した。骨髄中のアルブミン濃度は血中に比肩するレベルであった。さらに、同定された骨髄に豊富な代謝物の造血幹細胞への作用を検討するため、種々の代謝物を造血幹細胞培養に添加・除去して、代謝物が幹細胞維持に及ぼす影響の検討を実施し、同時に造血幹細胞に作用する基本的なサイトカインなどの、培地が含有する成分や酸素分圧などの培養条件を様々に変化させてその効果を検討した。フローサイトメーター等で解析して造血幹細胞やそれに由来する分化細胞に及ぼす影響の検討を行い、遺伝子発現プロファイルも確認した。その結果、アルブミン結合脂肪酸は造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルを維持し、かつ幹細胞性も維持できる因子であることが確認された。脂肪酸が欠乏すると速やかに造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルは変化し、代謝物要求性も変化した。また、アルブミンに結合しない遊離脂肪酸のみではむしろ細胞傷害活性を発揮することも確認された。その他、コレステロールも幹細胞性維持に重要であることが確認された。

第三年度には、前年度までの骨髄の代謝物構成と、その変容の実験検討の実施を継続した。また、同定された骨髄に豊富な代謝物の造血幹細胞への作用を検討するため、種々の代謝物を造血幹細胞培養に添加・除去して、代謝物が幹細胞維持に及ぼす影響の検討を実施した。基本培地の検討から初めて、サイトカインの組み合わせも造血幹細胞が必要とする SCF と thrombopoietin で十分で、濃度域も網羅的な検討を行って、細胞周期の静止期性を維持する条件と、細胞増殖を誘導する条件、幹細胞分化を誘導する条件を併用しながらいかなる局面で効果を発揮するか検討を行った。表面マーカーのフローサイトメーターを利用した解析のみならず必要に応じて機能的な解析やイメージングサイトメーターによる動態解析も併用して多面的な解析を実施して、骨髄内の代謝物が造血幹細胞に及ぼす生物学的な影響に関するデータセットを取得した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Sorimachi Yuriko, Karigane Daiki, Ootomo Yukako, Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Otsu Kinya, Kubota Yoshiaki, Okamoto Shinichiro, Goda Nobuhito, Takubo Keiyo	4. 巻 296
2. 論文標題 p38 plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100563 ~ 100563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Murakami Koichi, ... , Takubo Keiyo, Okamoto Shinichiro, Tamura Tomohiko, Nakajima Hideaki	4. 巻 34
2. 論文標題 OGT Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance via PINK1-Dependent Mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108579 ~ 108579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sera Yasuyuki, ... , Takubo Keiyo, Honda Hiroaki	4. 巻 137
2. 論文標題 UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 908 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo	4. 巻 1
2. 論文標題 Protocol for the Maintenance of Quiescent Murine Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100078 ~ 100078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2020.100078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Karigane Daiki, Kasahara Hidenori、 ... 、 Takubo Keiyo	4. 巻 62
2. 論文標題 Detection of residual disease in chronic myeloid leukemia utilizing genomic next generation sequencing reveals persistence of differentiated Ph+ B cells but not bone marrow stem/progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 679 ~ 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2020.1837366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsugawa Hitoshi, Kabe Yasuaki, Kanai Ayaka, Sugiura Yuki, Hida Shigeaki, Taniguchi Shun ' ichiro, Takahashi Toshio, Matsui Hidenori, Yasukawa Zenta, Itou Hiroyuki, Takubo Keiyo, Suzuki Hidekazu, Honda Kenya, Handa Hiroshi, Suematsu Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Short-chain fatty acids bind to apoptosis-associated speck-like protein to activate inflammasome complex to prevent Salmonella infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mikawa Takumi, Shibata Eri, Shimada Midori, Ito Ken, Ito Tomiko, Kanda Hiroaki, Takubo Keiyo, Lleonart Matilde E., Inagaki Nobuya, Yokode Masayuki, Kondoh Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101306 ~ 101306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Morikawa Takayuki, Tamaki Shinpei, Fujita Shinya, Suematsu Makoto, Takubo Keiyo	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification and local manipulation of bone marrow vasculature during intravital imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63533-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima T, Tanaka Y, Hamey FK., Chang CH, Oki T, Asada S, Hayashi Y, Fujino T, Yonezawa T, Takeda R, Kawabata KC, Fukuyama T, Umemoto T, Takubo K, Takizawa H, Goyama S, Ishihama Y, Honda H, Gottgens B, Kitamura T	4. 巻 29
2. 論文標題 Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G0 Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4144 ~ 4158.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuchiya N, Zhang R, Iwama T, Ueda N, Liu T, Tatsumi M, Sasaki Y, Shimoda R, Osako Y, Sawada Y, Kubo Y, Miyashita A, Fukushima S, Cheng Z, Nakaki R, Takubo K, Okada S, Kaneko S, Ihn H, Kaisho T, Nishimura Y, Senju S, Endo I, Nakatsura T, Uemura Y	4. 巻 29
2. 論文標題 Type I Interferon Delivery by iPSC-Derived Myeloid Cells Elicits Antitumor Immunity via XCR1+ Dendritic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 162 ~ 175.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.08.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, Hase K	4. 巻 178
2. 論文標題 Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1087.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Okinaga Ayumi, Hamano Fumie, Hashidate-Yoshida Tomomi, Watanuki Shintaro, Hishikawa Daisuke, Shindou Hideo, Arai Fumio, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Shimizu Takao, Takubo Keiyo	4. 巻 28
2. 論文標題 Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Sorimachi Yuriko, Yamamoto Masanichi, Okamoto Shinichiro, Takubo Keiyo	4. 巻 514
2. 論文標題 ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mima Yuichiro, Suzuki Satoshi, Fujii Takeshi, Morikawa Takayuki, Tamaki Shinpei, Takubo Keiyo, Shimoda Masayuki, Miyamoto Takeshi, Watanabe Kota, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Fujita Nobuyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Potential involvement of semaphorin 3A in maintaining intervertebral disc tissue homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 972 ~ 980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクト公式サイト <a href="https://takubolab.com/">https://takubolab.com/</a>
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Imperial College London			