

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08379

研究課題名（和文）生体イメージングによる造血幹細胞ニッチの加齢変化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of aging process of bone marrow niche by intravital imaging

研究代表者

森川 隆之（Morikawa, Takayuki）

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・研究員

研究者番号：80465012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は加齢に伴う造血幹細胞ニッチの変容を明らかにすることを目的とした。まずマウス骨髄のメタボローム解析やレポーターマウスの解析から、加齢に伴いマウスの骨髄で減弱しているシグナル経路を同定した。また組織染色やマウス骨髄の生体イメージングにより、骨髄の一部の血管内皮細胞が産生する代謝産物が骨髄の血流を維持し、造血幹前駆細胞の骨髄での血管外遊走に重要な役割を担っていることを示す証拠が得られた。これらの知見及び造血幹細胞移植、パラバイオシスの結果から骨髄での特定の代謝産物の減少が加齢に伴う造血幹前駆細胞の抹消から骨髄への移行効率の低下の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた加齢に伴う造血幹細胞ニッチの代謝動態の変容を示す知見から、これまで未解明であった造血幹細胞移植における加齢による生着率の低下の機序の全貌を明らかにすることのできる成果に結びつく学術的意義を持つと考えられる。また本研究成果の社会的意義としては、本研究成果を多くの血液疾患において重要な治療法である造血幹細胞移植の適応年齢の拡大に結びつく知見へと発展させることで、高齢化社会に十分に適応した医療体制の拡充に寄与する可能性があることなどがあげられる。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that hematopoietic stem cells are retained in the bone marrow niche in many adult mammals. In this study, we revealed how hematopoietic stem cell niche is changing with aging. The result of metabolome analysis showed that some signaling pathways were downregulated in aged mouse bone marrow. We validated one of the metabolites involved in these pathway is synthesized in vascular endothelial cells of bone marrow by immunohistochemistry. Using intravital imaging analysis, we also observed that this metabolite maintains bone marrow blood flow and facilitates transendothelial migration of hematopoietic stem progenitor cells in bone marrow. These results indicate that low homing efficiency of hematopoietic stem cells in aged bone marrow is caused by decreased NO production in stem cell niche.

研究分野：生体イメージング

キーワード：造血幹細胞 骨髄 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は白血病などの造血器疾患において重要な治療法のひとつであり、日本だけでも2013年では5000人を超える患者がその恩恵を得ているとされる。しかしながら、造血幹細胞移植の適応年齢は限られており、加齢とともに増加する造血器腫瘍のリスクに対応出来ているとは言い難い。その要因としては、高齢者における移植関連合併症に加え、移植した造血幹細胞の骨髄への移行・生着の効率が加齢とともに減少していくことなどが挙げられる。この加齢に伴う造血幹細胞の骨髄への移行・生着効率の低下の一因として造血幹細胞を維持している微小環境(ニッチ)の加齢変化の関与が予測されていた。また骨髄ニッチは間葉系間質細胞、血管、神経細胞、成熟血球や骨芽細胞など、多数の細胞から成り、それぞれがサイトカインやケモカイン、接着分子などを介して造血幹細胞の幹細胞性を維持していることが徐々に解明されてきていたものの、その加齢変化の全貌は明かではなかった。そこで本研究課題では様々な要素からなる骨髄ニッチのどのような加齢に伴う変化が、移植造血幹細胞の生着率の低下に関わっているかを明らかにすることを旨とした。

2. 研究の目的

先行研究で骨髄ニッチの加齢に伴う代謝動態の変化に着目し2.5ヶ月齢のマウスと14ヶ月齢のマウスの骨髄の代謝物をメタボローム解析により比較したところ、特定の代謝物の産生経路が加齢とともに減弱していることを示唆する結果を得ていた。それらの代謝物の生体内での働きのひとつとして局所血管の拡張やVEGF産生を介して血管の透過性を亢進することがこれまでの知見により知られていた。そこで仮説として「骨髄では特定の代謝物シグナルが血流や血管透過性を制御しており、このシグナル経路が加齢とともに減弱することで、移植された造血幹細胞の血管内から血管外への移行が妨げられる」と考え、この作業仮説の検証を目的とした。

3. 研究の方法

1. 骨髄代謝物による骨髄血管の細胞透過性変化の検証

i) 骨髄代謝物の骨髄血管の血流と細胞透過性への関与

骨髄血管から血管外へ移行する細胞を *in vivo* で可視化し、その数を経時的に捉えるためにC57BL/6マウスにGFPマウスの造血幹前駆細胞へ移植する実験系、またはパラバイオシスを用い、C57BL/6の頭蓋骨骨髄の血管、及び造血幹前駆細胞を多光子レーザー顕微鏡により可視化した。このとき骨髄の特定の箇所では血球の血管内から血管外への移行が見られたが、単位時間あたりに移行した細胞の数と局所血流量(赤血球速度と血管径より算出)を、定常時、代謝阻害時、代謝化合物曝露時と比較した。

ii) 骨髄代謝物の骨髄血管の造血幹細胞透過性へ関与

移植した造血幹細胞の血管内から血管外への移行を可視化するため、緑色蛍光蛋白(GFP)マウスの造血幹細胞をセルソーターにより分離してC57BL/6マウスに静脈内投与した。頭蓋骨では骨髄に移行したGFP陽性細胞の時空間動態を、大腿骨・脛骨では骨髄全体でそれらの定量的評価を実施した。

2. 骨髄ニッチにおける代謝制御メカニズムの検証

血管内皮細胞に発現する着目した代謝産物が関与するシグナルの上流として特定の神経伝達物質が知られていた。この神経伝達物質は、2.5ヶ月齢と14ヶ月齢のマウスの骨髄の代謝物を比較したメタボローム解析の結果から、加齢に伴い減少していることが示唆されていた。また、この神経伝達物質によるシナプス伝達の競合阻害薬を投与したマウスでは着目した骨髄の神経伝達物質濃度が減少する知見が得られたことから、この骨髄の神経伝達物質の産生源は副交感神経であることが予想されていたが、産生源となる副交感神経が血管近傍で認められなかった。そこでこの骨髄の神経伝達物質の産生源を探るため、該当物質の発現細胞特異的にGFP蛋白を発現するマウスの骨髄細胞の解析を行った。着目した神経伝達物質が非神経細胞である可能性も考慮し、フローサイトメーター(FACS)と各種細胞マーカーを用いた細胞種の特定も試みた。

3. 骨髄代謝動態の造血幹細胞生着効率への関与とその加齢による変化の検証

骨髄の代謝変化により造血幹細胞移植効率が下がるかを検証するため、着目した代謝物の遺伝子欠損マウスにGFPマウスの造血幹細胞を移植し、生着率を野生型マウスに移植したときとFACSを用いて比較した。

4. 研究成果

まず造血幹前駆細胞の血流中から骨髄実質への血管外遊走における代謝産物の役割の解析のため、GFPマウスの骨髄から造血幹前駆細胞をセルソーターと造血幹前駆細胞マーカーを用いて分取し、これらの細胞100万個を麻酔下の野生型のマウスに静脈内投与した。投与されたGFP陽性の造血幹前駆細胞は血流に乗って頭蓋骨骨髄に移行するが、この移行してきたGFP陽性細胞を多光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージングにより捉えた。その結果、骨髄に移行した造血幹前駆細胞のいくつかは血管外遊走の場である類洞血管の壁に接着し、定常状

態では約 25 分かけて骨髄の実質へと移動した。そこで着目した代謝経路の阻害剤を 10 mM の濃度で経頭蓋骨投与したところ、造血幹前駆細胞の血管内から骨髄実質への移行時間は 43.6 分と約 2 倍に延長した。また血管内皮に発現する当代謝物の欠損マウスの造血幹前駆細胞の血管外移行に要する時間は 64.1 分と野生型マウスと比較して約 3 倍に延長していた。さらにこの遺伝子欠損マウスの頭蓋骨骨髄に当代謝物と同様の働きを持つ化合物を 100 μ M の濃度で局所投与したところ、造血幹前駆細胞の血管外への移行時間は 28.6 分と、野生型マウスとほぼ同レベルとなった。これらの結果から、造血幹前駆細胞の血流中から造血幹細胞ニッチへと移行する効率は、骨髄中で産生される着目していた代謝物によって維持されている可能性が示唆された。また、造血幹前駆細胞の血流中から骨髄実質への血管外遊走における代謝シグナルの役割の解析のため、GFP マウスの造血幹前駆細胞を骨髄非破壊で野生型マウスと遺伝子欠損マウスのそれぞれに移植し、16 時間後 FACS により骨髄中の GFP 陽性細胞の数を測定した。その結果遺伝子欠損マウスの骨髄中造血幹前駆細胞の数は野生型マウスと比較して減少傾向が見られ、造血幹前駆細胞の血流中から造血幹細胞ニッチへの移行が、着目した代謝物によって維持されている可能性を支持するデータを得た。この骨髄における当代謝物の制御メカニズムを検証するため、この代謝産物を含むシグナルの上流に位置する神経伝達物質に着目した。先行研究においてマウス骨髄から当神経伝達物質が検出されていることから、神経細胞のマーカーに対する抗体を用いた免疫組織染色を試みた。その結果神経細胞のマーカーである β III チュブリン陽性細胞に着目した神経伝達物質の発現は認められなかった。またこの神経伝達物質の GFP レポーターマウスでも骨髄の神経における GFP の発現を示す所見は見られなかった。一方で多光子レーザー顕微鏡によるレポーターマウスの頭蓋骨骨髄の生体イメージングでは、その形態的特徴から血球系と思われる細胞で GFP の発現が見られた。そこで骨髄の血球系の細胞での神経伝達物質の発現を検証するため、GFP レポーターマウスの骨髄単核球の GFP 陽性細胞を FACS にて精査した。その結果、分化細胞、未分化細胞のそれぞれの一部に GFP の発現が見られ、血球系の細胞が産生する神経伝達物質により骨髄の代謝が制御されている可能性が示唆された。さらに加齢による造血幹前駆細胞の抹消血から骨髄の移行への影響を検証するため、GFP マウスからセルソーターで分取した造血幹前駆細胞を静脈内投与し、多光子レーザー顕微鏡を用いた頭蓋骨骨髄の生体イメージングにより GFP 陽性細胞の骨髄で血管壁接着から血管外へと遊走する時間を若齢マウスと高齢マウスとで比較した。その結果若齢マウスと比較して高齢マウスの骨髄では、当該遺伝子欠損マウスの骨髄同様、造血幹前駆細胞が血管外へ遊走する時間が延長していた。この高齢マウスで延長が見られた造血幹前駆細胞の血管外移行時間は、着目した代謝産物と同様の働きをもつ化合物の骨髄局所投与により若齢マウスと同レベルまで回復した。次いで当代謝物が末梢血から骨髄への移行に関わるかを骨髄全域で検証するため GFP マウスの造血幹前駆細胞を当該遺伝子欠損マウスに骨髄非破壊状態で移植した後、フローサイトメトリーにより骨髄中の GFP 陽性細胞の数を野生型マウスと比較した。その結果遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して移植後 16 時間の GFP 陽性細胞の数が減少していた。さらに当代謝物の造血幹前駆細胞の抹消血から骨髄への定常状態での移行における役割を検証するため遺伝子欠損マウスと GFP マウスのパラバイオシスを実施した。その結果、結合後 2 週間の遺伝子欠損マウスの骨髄中の GFP 陽性の造血幹前駆細胞はコントロール群の野生型マウスと比較して減少していた。次いで高齢マウスと GFP マウス、及び若齢マウスと GFP マウスのパラバイオシスを実施し、結合 2 週間後の骨髄中の GFP 陽性細胞の数を高齢マウスと若齢マウスとで比較したところ、若齢マウスと比べ高齢マウスの骨髄中の GFP 陽性の造血幹前駆細胞は減少していた。これらの結果から骨髄での特定の代謝経路の減弱が加齢に伴う造血幹前駆細胞の抹消から骨髄への移行効率の低下の一因となっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5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 -
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 -
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 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 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 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 Goto Shinichi, Morikawa Takayuki, Kubo Akiko, Takubo Keiyo, Fukuda Keiichi, Kajimura Mayumi, Suematsu Makoto	4. 巻 63
2. 論文標題 Quantitative imaging mass spectroscopy reveals roles of heme oxygenase-2 for protecting against transhemispheric diaschisis in the brain ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 70 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.17-136	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 Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M	4. 巻 9
2. 論文標題 Gold-nanofeve surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03899-1	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takayuki Morikawa, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Age-related alteration in nitric oxide signaling attenuates arrival of transplanted hematopoietic stem/progenitor cells to bone marrow
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Morikawa, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Aging impairs NO-mediated migration of transplanted hematopoietic stem/progenitors to bone marrow
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------