

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08860

研究課題名(和文) 栄養環境変化による造血幹細胞恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Study of the regulatory mechanisms of hematopoietic stem cell homeostasis mediated by alterations in the nutritional environment

研究代表者

田所 優子 (TADOKORO, Yuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食餌によって変化する腸内細菌由来代謝産物による造血幹細胞の恒常性維持機構について解明することを目的として、高脂肪食および繊維食により変動する腸内細菌由来代謝物の探索と造血幹細胞への影響の解析を行った。その結果、高脂肪食で変動する代謝物に造血幹細胞の機能抑制に作用するものが存在することを見出した。さらに、高繊維食による腸内細菌の変化で変動する代謝物の中に、造血幹細胞の未分化性維持に作用するものが存在することを明らかにした。本研究により、食餌により変化する腸内細菌由来代謝産物による造血幹細胞の恒常性維持機構の解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食生活の異常は肥満や生活習慣病などの原因となるが、造血幹細胞に対する影響については十分理解されていない。本研究成果においては、食餌による腸内細菌由来代謝産物の変化が造血幹細胞の機能制御に影響することを見出した点において学術的重要性がある。このような代謝物の機能は種を超えて共通性を示すことが考えられることから、本研究成果は幹細胞機能の制御機構を理解する上で重要な知見である。造血異常は白血病発症や様々な加齢性疾患の発症にも関わることから、食生活と造血異常に起因する疾患との関係を考える上で本研究成果の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：An excessively unbalanced diet is one of the causes of obesity and lifestyle diseases. In this study, we aim to elucidate the regulatory mechanisms of hematopoietic stem cell (HSC) homeostasis mediated by gut microbiota-derived metabolites, which are altered by dietary habits. We have found that a gut microbiota-derived metabolite induced by a high-fat diet feeding suppresses the HSC functions. Furthermore, we have shown that a gut microbiota-derived metabolite induced by high-dietary fiber diet feeding enhances the HSC functions. Our findings may contribute to development of prevention and treatment improvement of leukemogenesis and lifestyle diseases caused by diet-induced hematopoietic abnormalities.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 自己複製

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の運命は、骨髄微小環境(ニッチ)において生じる様々なストレスの影響を受ける。これまでの研究で、細菌感染や加齢による慢性炎症や活性酸素による DNA 損傷などのストレスは造血幹細胞の自己複製能制御システムを破綻させることが知られている。一方で、過食のような偏った食生活は様々な臓器に悪影響を及ぼすが、造血幹細胞の機能への影響については理解が進んでいない。

我々はこれまでに、RAS-MAPK 経路の抑制シグナルが、高脂肪食による造血幹細胞の異常な自己複製亢進と白血病化を抑制する役割を果たしており、その自己複製能調節機構の破綻には腸内細菌叢の構成変化が関与していることを見出してきた(Tadokoro et. al., *Cell Stem Cell*, 2018)。この結果は、骨髄から遠い場所に存在する腸内細菌叢が、何らかのメディエーターを介して造血幹細胞の自己複製能を制御していることを意味する。我々の予備的研究により、腸内細菌由来の代謝産物が重要な役割を果たし、さらに加齢に伴う造血幹細胞障害(幹細胞エイジング)の原因になっているのではないかという知見を得た。本研究の推進により、代謝産物を介した全身性の幹細胞制御機構を明らかにし、食餌によって幹細胞機能をコントロールできるようになることが期待される。

### 2. 研究の目的

造血幹細胞は一生涯にわたって造血を維持するために、様々なストレスに対応するシステムが備わっており、その破綻は造血障害となって現れる。過食などの食生活の異常は、肥満や生活習慣病などの原因となるが、造血幹細胞に対してどのような影響を及ぼすかについては十分理解されていない。我々は最近、高脂肪食摂取による腸内細菌叢の変化が造血幹細胞の自己複製能調節機構を破綻させることを見出した。この知見をもとに本研究では、食餌によって変化する腸内細菌叢由来代謝物による造血幹細胞の恒常性維持機構について解明することを目的とする。目的達成のために、1)食餌、特に高脂肪食および高繊維食により変化する腸内細菌叢由来代謝物の造血幹細胞に及ぼす影響と分子メカニズム、および、2)加齢に伴う造血幹細胞障害への関与を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の3つの課題を設定し、食餌性腸内細菌叢由来代謝物による造血幹細胞の恒常性維持機構についてその分子基盤の解明を進めた。主に高脂肪食と高繊維食の影響について解析を行った。造血幹細胞の機能制御における分子メカニズムの解明には、我々がこれまでに造血幹細胞の自己複製能制御に重要な役割を果たすことを報告してきた、アクチン動態制御に関わる ROCK シグナルと増殖制御にかかわる ERK シグナルに焦点を当てて解析を行った。

#### (1) 食餌性腸内細菌叢由来代謝物の探索

##### 食餌性腸内細菌叢由来代謝物の網羅的探索

食餌により変動する腸内細菌由来代謝産物を調べるために、通常食・高脂肪食・高繊維食・低繊維食を摂取したマウスの血漿を採取し、質量分析法により網羅的な解析を行った。それぞれを比較し、変化のあった候補代謝物については液体クロマトグラフィー・質量分析法により確認・定量を行った。

##### 造血幹細胞機能の解析

上記で特定した代謝物について、in vivo 骨髄移植による骨髄再構築能解析・in vitro 培養解析・フローサイトメトリー解析などにより、造血幹細胞機能に対する作用の解析を行った。

#### (2) 食餌性腸内細菌叢由来代謝物による造血幹細胞恒常性維持機構の解明

##### 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞におけるアクチン動態制御の解析

造血幹細胞培養において上記で特定した代謝物を添加し、免疫染色法により、F-アクチン染色によるアクチン重合、造血幹細胞の自己複製制御に関わる Spred1 の発現量、アクチン動態により局在が変化する MKL1 の細胞内局在の解析を行った。

##### 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞における ERK シグナル制御の解析

造血幹細胞培養において上記で特定した代謝物を添加し、リン酸化 ERK の免疫染色を行い、ERK シグナルの活性化状態を評価した。

##### 腸内細菌由来代謝物の造血幹細胞機能に対する影響の解析

腸内細菌由来代謝物の造血幹細胞機能に対する影響を解析するために、代謝物を野生型マウスへの投与を行った。投与マウスの骨髄から造血幹細胞を採取し、Spred1・リン酸化 ERK・MKL1 の免疫染色を行い、シグナル制御の解析を行った。また、造血幹細胞の機能解析を行うために、投与マウスの骨髄細胞を採取し、骨髄移植法により機能評価を行った。

さらに、造血幹細胞の白血病化への影響も調べるために Spred1 欠損マウスへの投与も行い、定期的に末梢血を採取し、フローメトリー解析を行った。

### (3) 腸内細菌叢由来代謝物による幹細胞エイジングへの関与の解明

加齢により変化する腸内細菌叢由来代謝物の網羅的探索

若齢マウスおよび老齢マウスの血漿を採取し、質量分析法により代謝産物の網羅的解析を行った。加齢による代謝物の変化を比較すると共に、食餌による変化とも比較を行い、加齢と食餌による代謝物変化の解析を行った。

食餌および腸内細菌叢由来代謝物による老化表現型への介入

食餌および腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞エイジングへの影響を観察するために、野生型マウスに対し、繊維食の摂取および代謝物の投与を行った。定期的に末梢血を採取し、フローサイトメトリー解析により造血の加齢変化を解析した。また、それらのマウスの骨髓細胞を採取し、骨髓移植により造血幹細胞の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 食餌により変動する腸内細菌由来代謝産物を調べるために、通常食・高脂肪食・高繊維食・低繊維食を摂取したマウスの血漿を採取し、質量分析法により代謝物の網羅的解析を行った。それぞれを比較し、変化のあった代謝物について液体クロマトグラフィー・質量分析法により定量を行った。その結果、通常食に比べて、高脂肪食摂取で増加する代謝物1種類と減少する代謝物1種類を同定した。また、高脂肪食摂取で増加する代謝物は、高繊維食摂取マウスにおいて低下していることを見出した。この代謝物に関して野生型マウスへの長期投与を行い、骨髓解析を行った。その結果、造血幹細胞画分の細胞数が減少していることを見出した。高脂肪食で増加し、高繊維食で低下する代謝物に関して、造血幹細胞の機能低下に作用するものが存在することが明らかとなった。

(2) 上記代謝物による、造血幹細胞におけるシグナル経路の変化の解析を行った。その結果、上記代謝物により、野生型マウス造血幹細胞のアクチン重合は低下し、その結果、MKL1の細胞核局在の割合が減少し、細胞質への移行が観察された。また、造血幹細胞の自己複製能を抑制的に制御する Spred1 の発現上昇が誘導された。さらに、造血幹細胞の白血病化への影響も調べるために Spred1 欠損マウスへの代謝物投与を行った。その結果、代謝物投与した Spred1 欠損マウスにおいて、末梢血における骨髓球系細胞が徐々に増加し、最終的に高脂肪食を摂取した時を同様に、慢性骨髓性白血病様の病態を発症し、野生型マウスに比べて有意な差において死亡した。慢性骨髓性白血病様の病態を発症した代謝物投与 Spred1 欠損マウスの骨髓細胞を解析した結果、造血幹細胞画分において ERK シグナル経路の活性化が認められた。これらの結果から、この高脂肪食摂取で増加する代謝物は、造血幹細胞の自己複製能制御シグナル経路に作用し、造血幹細胞の機能低下や白血病発症に関与することが明らかとなった。

また、高繊維食摂取によって上昇した代謝物に関して、造血幹細胞の機能制御に対する効果の解析を行った。まず、造血幹細胞培養への添加実験を行った。培養1週間後に、フローサイトメーターにより細胞表面マーカーの解析を行った結果、代謝物添加によって未分化性の維持に作用していることが明らかとなった。この代謝物添加によって1週間培養した造血幹細胞の機能解析を行うために骨髓移植解析を行った。その結果、代謝物添加により骨髓再構築能が亢進することが明らかとなった。さらに、野生型マウスに代謝物を長期投与し、骨髓解析を行った。その結果、代謝物投与により造血幹細胞画分の増加が抑制されていた。また、骨髓細胞を採取し骨髓移植解析を行った結果、代謝物投与により骨髓再構築能が亢進することが明らかとなった。以上の結果から、高繊維食摂取による腸内細菌の変化で変動する代謝産物の中に、造血幹細胞の未分化性維持に作用するものが存在することが明らかとなった。

(3) 若齢マウスおよび老齢マウスの血漿を採取し、質量分析法により代謝産物の網羅的解析を行った。さらに、食餌による変化とも比較を行い、加齢と食餌による代謝物変化の解析を行った。その結果、上記で同定した高脂肪食摂取で増加する代謝物は、老齢マウスの血漿でも増加していることを見出した。この代謝物は、高繊維食摂取において血漿中濃度が低下することから、野生型マウスに高繊維食を与え、造血の加齢変化の観察を行った。その結果、高繊維食摂取により加齢に伴う骨髓球系細胞の増加が抑制されることを見出した。現在、造血幹細胞の変化や、代謝物投与による影響の解析を進めている。

以上の結果から、本研究の推進によって、食餌により腸内細菌由来代謝物がダイナミックに変動することが明らかとなった。このような食餌によって変動する腸内細菌由来代謝物の中には、造血幹細胞の機能制御に関わるシグナル経路に作用するものが存在し、造血幹細胞の自己複製および分化制御、さらには、白血病化にも関与することが明らかとなった。また、食餌により変動する腸内細菌由来代謝物の中には、加齢によっても変動するものが存在することが明らかとなった。このような腸内細菌由来代謝物は、造血幹細胞エイジングや造血の加齢変化に関与していることが示唆された。研究期間全体を通して、適切な食生活がいかに造血幹細胞の恒常性維持に重要であるかが明らかとなった。今後、食餌や腸内細菌由来代謝物によって造血幹細胞の機能をコントロールし、造血の老化や加齢性疾患の発症を制御できるようになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naho Nomura, Chiaki Ito, Takako Ooshio, Yuko Tadokoro, Susumu Kohno, Masaya Ueno, Masahiko Kobayashi, Atsuko Kasahara, Yusuke Takase, Kenta Kurayoshi, Sha Si, Chiaki Takahashi, Masaaki Komatsu, Toru Yanagawa & Atsushi Hirao	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner	5. 発行年 2021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/s41598-021-81076-z	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 Masaya Ueno, Takuya Tomita, Hiroshi Arakawa, Takahiro Kakuta, Tada-aki Yamagishi, Jumpei Terakawa, Takiko Daikoku, Shin-ichi Horike, Sha Si, Kenta Kurayoshi, Chiaki Ito, Atsuko Kasahara, Yuko Tadokoro, Masahiko Kobayashi, Tsutomu Fukuwatari, Ikumi Tamai, Atsushi Hirao & Tomoki Ogoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Pillar[6]arene acts as a biosensor for quantitative detection of a vitamin metabolite in crude biological samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	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/s42004-020-00430-w	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 Tadokoro Yuko, Hirao Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of Nutrients in Maintaining Hematopoietic Stem Cells and Healthy Hematopoiesis for Life	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1574 ~ 1574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031574	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6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 陳 茜、田所 優子、司 沙、本田 浩章、平尾 敦
2. 発表標題 造血器腫瘍制御に寄与する食物栄養依存性代謝物の探索
3. 学会等名 第25回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Tadokoro
2. 発表標題 Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites
3. 学会等名 Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology Between SNU-GCRC and KU-CRI (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田所 優子
2. 発表標題 Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress.
3. 学会等名 第15回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田所 優子
2. 発表標題 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞の機能制御
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Tadokoro
2. 発表標題 Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites
3. 学会等名 International symposium on tumor biology in Kanazawa 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田所 優子
2. 発表標題 加齢に伴う造血の変化 造血幹細胞エイジングに着目して
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会 合同年会 BPNP2021 サテライトシンポジウム B6J Aged研究会 第3回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田所 優子、平尾 敦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 479
3. 書名 週刊 医学の歩み、治療標的としてのがん幹細胞、Spred1による造血幹細胞制御と白血病化	

1. 著者名 田所 優子、平尾 敦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 127
3. 書名 別冊・医学の歩み、治療標的としてのがん幹細胞、Spred1による造血幹細胞制御と白血病化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

がん進展制御研究所 遺伝子・染色体構築研究分野ホームページ <a href="http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp/">http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp/</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
---------	---------