

機関番号：82601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成20年度～平成23年度

課題番号：20590388

研究課題名 (和文) 生体異物相互作用の場としてのいわゆる造血幹細胞ニッチを介した活性酸素障害発現機構

研究課題名 (英文) Mechanism of functional impairment of the hematopoietic stem cell niches by oxidative stress in the site of xenobiotic interrelationship

研究代表者

平林容子 (HIRABAYASHI YOKO)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部・室長

研究者番号：30291115

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：造血幹細胞・幹細胞ニッチ・生体異物相互作用・細胞周期・酸化ストレス

1. 研究計画の概要

本研究は、(1) 低酸素状態で維持される幹細胞の静止期[dormancy]における維持機構と、細胞周期内における自己複製の調節機構、(2) 造血幹細胞の細胞周期静止機構の成立とこれにかかる新生児期の造血動態変化の分子機構、(3) 造血幹細胞特異的細胞周期測定法と定常状態[steady state]における細胞周期静止分画の酸化ストレス蓄積過程としての加齢・老化に伴う変化、の3点から構成され、これら活性酸素の関与した造血の調節機構を、生理機構と病的障害機構の両面から追求した。

2. 研究の進捗状況

(1) セルソータによって得られる骨髄細胞の未分化な造血幹細胞は、分化抗原(Lin)陰性、c-kit 及び Sca-1 陽性の LKS 分画として得られるが、このうち造血ニッチとの接着を維持する $\alpha 2$ -integrin 高発現分画では、①比較的低酸素状態のチオレドキシシン(Trx)過剰発現マウスでの分画から、②野生型、③Trx 欠乏状態のマウスへと、酸化ストレスの増加に従って、細胞内活性酸素種量を反映した2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetateの蛍光強度の高い亜分画の増大を認めた。これはニッチにおける酸素分圧の勾配の存在を想定させる。

(2) 当研究者等は造血幹細胞特異的に細胞周期を測定する方法(浸透圧ミニポンプなどによる持続的なプロモデオキシユリジン[BrdUrd]の投与と、それら BrdUrd 取り込み細胞の紫外線 [UVA]による淘汰)によって、コロニー形成能を有する造血幹・前駆細胞の静止期分画の大きさがマウスの半生にわたって変化しないことを見出している。他方、

胎生 14 日ないし新生児の肝臓の造血細胞並びに生後 2・4・6・8 週齢までの骨髄細胞での培養性コロニー形成細胞の静止期分画は、予想通り経時的に急速に拡大していた。また、より未分化な LKS 分画では、2 ヶ月齢で観察した静止期分画より 6 ヶ月齢での静止期分画の大きさが減少することを見出した。すなわち、コロニー形成能を有する造血幹・前駆細胞では、8 週齢前後で、静止期分画が成立するのに対して、より未分化な LKS 分画ではこれが 8 週齢以降に遅れる可能性を見出した。(3) 23 ヶ月齢マウスでの前駆細胞分画の細胞動態解析を行い、分化型前駆細胞においては 3 ヶ月齢マウスとの差異は乏しいものの、未分化型前駆細胞においては、3 ヶ月齢マウスに比べて倍加時間が延長し、静止期分画も大きいという、これまでの文献あるいは実験的データの示唆通り、造血活性の予備能力の抑制状態にあることが伺われた。さらにこの背景として、Runx と協調する造血機能性転写因子 Cbfb、epigenetic gene silencer の転写因子 Trim28、さらに Akt の抑制因子で脱リン酸化酵素の Phlpp1 などの発現が、加齢個体で特異的に抑制されていることを見出した。

3. 現在までの達成度

(2)及び(3)の検討は、おおむね順調に進展している。(1)で検索対象としている幹細胞分画は、文献的にも自らのデータからも、LKS 分画以外の未分化幹細胞の存在が示唆されたことから、Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁺分画などの分画に、より未分化な幹細胞が存在することを作業仮説として LKS 分画と併行して検討を進めることとした。この為、酸化ストレスとしての活性酸素種の局所定量に関する検索にや

や遅れが生じた。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) 静止期の維持や細胞周期内における自己複製に果たす酸化ストレスの役割について、DCFH-DA 色素による蛍光強度や、ミトコンドリアの膜電位などを指標に計測し、定常状態と 5FU 投与後の細胞回転亢進状態とを比較する。さらに関連分子の検索を併行して進める。
- (2) 引き続き LKS 分画での静止期分画の成立に関する検討を進めるとともに、当該過程におけるニッチ機能の指標として、N-cadherin や Tie2 の発現変化を観察する。
- (3) Cx32 knockout マウスでは骨髄の chromodomain helicase DNA-binding protein 4 の発現の低下に伴う促進加齢状態が想定されるので、併行して N-cadherin や Tie2 の発現ならびに幹細胞分画での Notch の発現を、加齢個体での骨髄細胞での網羅的遺伝子発現検索結果と比較することにより、ニッチ構成分子機構の加齢影響について検討を進める。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Hirabayashi Y, Inoue T. 2010. Benzene-induced bone-marrow toxicity: a hematopoietic stem-cell-specific, aryl hydrocarbon receptor-mediated adverse effect. *Chem Biol Interact* 184(1-2): 252-258. 査読有り
2. Otsuka K, Hirabayashi Y, Tsuboi I, Inoue T. 2010. Regeneration capability of Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺ cells with or without radiation exposure for repopulation of peripheral blood in lethally irradiated mice monitored using Ly5.1 isotype on days 35, 90, and 270 after transplantation. *Exp Hematol* 38(5): 417-425. 査読有り
3. Hirabayashi Y, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida, K, Dainiak, N., Inoue T. 2009. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol* 37(2): 195-205. 査読有り
4. Hirabayashi Y, Inoue T. 2009. Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 77(4): 521-535. 査読有り
5. Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T. 2008. Benzene-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone marrow cells: time after benzene

treatment and recovery. *Chemosphere* 73(1 Suppl): S290-294. 査読有り

[学会発表] (計 37 件)

1. Hirabayashi Y, Tsuboi I, Sekita K, Kanno J, Kusunoki Y, Inoue T: Radiation and senescence: Deceleration of cell-cycle in primitive hemopoietic progenitors (CFU-S13) was only significant parameter during aging, which was reactively accelerated after 2Gy whole-body irradiation. Society of Toxicology 50th Annual Meeting & ToxExpo (2011.3.8) Washington DC, USA.
2. Hirabayashi Y, Yoon BI, Igarashi K, Kodama Y, Sekita K, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: Strain differences of the effect of benzene exposure: microarray study of the bone marrow in C57BL/6 and C3H/He mice. IUTOX 2010 -XII International Congress of Toxicology (2010.7.21) Barcelona, Spain.
3. Hirabayashi Y: Benzene-induced toxicity is based on the AhR-mediated hematopoietic stem cells *Benzene 2009: Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity, Implication for t-AML and the Mode of Action Framework*. (2009.9.10) Munich, Germany.
4. Inoue T, Hirabayashi Y: Thioredoxin-overexpression mice prevent benzene-induced lymphoma/leukemias: Experimental model for possible beneficial role in anti-oxidative stress by broccoli (Sulforaphan). Asia Pacific Symposium on Food Safety 2009 (2009.11.13) Seoul, Korea.
5. Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, (3人省略), Ott T, Trosko JE, Inoue T: Connexin 32 maintains quiescent hematopoietic progenitor cells in Lin⁻/c-kit⁺/Sca1⁺ fraction: Analysis of the cell cycle. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.14) Cairns, Australia.

[図書] (計 2 件)

1. Hirabayashi Y, Inoue T. 2011. Commonality and Stochasticity in Systems Toxicology. In: *Handbook of Systems Toxicology*, Vol. 1, (Casciano DA, Sahu SC, eds). Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd., 432-460.
2. Hirabayashi Y, Inoue T. 2008. Principles of data-mining in toxicogenomics. In: *Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment*, (Sahu SC, ed). Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd., 57-84.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当しない