

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

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 underlying functional impairment of hematopoietic stem cell niches caused by oxidative stress at 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

研究成果の概要：造血の調節機構における活性酸素の役割を、生理機構と病的障害機構の両面から検討する事を目的として、1) 造血幹・前駆細胞の静止期[dormancy]における維持並びに細胞周期内における自己複製の調節、2) 造血幹・前駆細胞における細胞周期静止機構の成立並びにこれにかかる新生児期の造血動態変化の分子機構、3) ストレス蓄積過程としての加齢・老化に伴う細胞周期静止期分画の変化、について検討した。造血幹・前駆細胞の分化段階に応じて機能的に異なった制御システムが想定され、異なった造血支持の機能が存在する可能性が想定された。

The aims of this study were to focus on and analyze the hematopoietic regulatory system on the basis of three aspects, specifically focusing on the effects of reactive oxygen. The first aim was to analyze the maintenance system of stem cells during the dormancy period and the system regulating their self-renewal during the cell cycle. The second aim was to examine the developmental termination of the cell cycle of hematopoietic stem cells and the molecular mechanisms related to hematopoietic kinetic changes during the developmental stage. The third aim was to examine changes in the cell-cycle fraction during the senescent stage with stress accumulation. As a result, a functionally different regulatory system was found to exist during stem cell differentiation, and a different regulatory mechanism during hematopoietic development is supposed to be present.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,000,000	0	1,000,000
21年度	900,000	0	900,000
22年度	900,000	0	900,000
23年度	800,000	0	800,000
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：医歯薬

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. 研究開始当初の背景

低用量の活性酸素や酸化ストレスが様々な生命活動に果たすシグナル伝達調節機構と、高用量におけるそれらの生体障害の両面が明らかになりつつある。即ち、生体は高用量の活性酸素を消去する機構を備えて

初めて生存が可能となったが、他方、低用量反応としての酸化ストレスに対する生体応答は、種々の転写因子の遺伝子発現調節に関わり、生体の調節維持機構として必須の役割を担っていることがわかってきた。そこで造血幹細胞の維持機構に関与する低用量活

性酸素種の生理的分子機構と、その調節障害に関わる分子機構を次の要領で明らかにすることを企図していた。すなわち本研究の構成部分は、**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点に基づいていた。従って本研究の目的は、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検討することにあつた。

これらの背景として、1)との関係では6 Gyの放射線照射によっても生残する放射線抵抗性造血幹細胞の同定および、その維持に関与する低酸素環境について推論した当申請者らの研究は、その創生的知見と考えられる(Inoue et al. 1995)。続いてこれを保証し、造血幹細胞を活性酸素種(ROS)から隔離する物質的機構としての骨髄骨芽細胞におけるN-cadherin (Zhang et al. 2003) や、Tie2 (Arai et al. 2004) によるニッチと称される「接着の場」の形成が認識されるに至った。ここに定着する静止期造血幹細胞は、一方で、低酸素下では静止期を維持し、Notch (Milner et al. 1994)、Wnt (Reya et al. 2003)、及び Sonic hedgehog (Shh) (Bhardwaj et al. 2001) などのシグナル、ならびに、Bmi-1 (Lessard et al. 2003) の発現を受けた幹細胞性[stemness]が支えるが、他方、Notch 受容体を介して骨芽細胞から産生される Jagged1 シグナルを受け、自己複製的増殖も併行して行う。興味深い点は、未だ推測段階にあるが、このニッチ内では、当申請者等が見出したコネクシン(Cx)32 が介在して造血幹細胞の静止期維持に関与する予備的所見が得られており、分化を伴わない自己複製能の安定的維持に貢献していると考えられ、Cx32 遺伝子欠失(KO)マウスでは、ROS の消去機能に欠陥が示唆されることである(Hirabayashi et al. 2007; *ibid* 2007)。

他方、2)との関係では、当申請者らが考案した造血幹細胞特異的細胞周期測定法(BUUV法: Hirabayashi et al. 2002; *ibid* 1998)によれば、造血幹細胞静止期分画の成立時期は2週齢から4週齢にあると予想され、その結果は、この時期にN-cadherin 陽性骨芽細胞分画が骨髄で急速に増加し、相反的にPECAM 陽性細胞が減少するとの最近の国内外の報告と符合する。即ち、造血維持機構はこの時点で質的に大きく何らかの転換をす

るものと当申請者らは仮説している。

さらに**3)**に関しては当申請者らは、先のBUUV法によって、前項で成立した静止期分画が、その後成熟期を経て長く老年期に至るまで、出入りのない分画として骨髄に維持されることをみている。この分画[population]を試算すると、造血前駆細胞の7割に及び、その維持機構には前述のCx32も関与している(Hirabayashi et al. 2007; *ibid* 2007)。

以上、造血幹細胞の維持機構に関与するROSの役割からみた学術的背景を述べたが、当申請者らはこの他、酸化ストレス消去分子Thioredoxin (Trx)の発現制御マウス(Mitsui et al. 2002; Hirabayashi Y, Inoue T. 2007; Li GX et al. 2006; Yoon BI et al. 2005) や、Cx32-KOマウス(Yoon BI et al. 2004)、AhR-KOマウス(Hirabayashi Y 2005; Hirabayashi Y et al. 2005; *ibid* 2003)などを用いた研究を行っており、これらを本研究の基礎として発展させたい。

2. 研究の目的

各種の幹細胞が再生医療への展望で注目される一方で、幹細胞とこれを支えるいわゆるニッチ[niche]には、前者に幹細胞特異的薬物代謝酵素(例えばCytochrome P450 2E1 [Cyp2E1])や異物受容体(aryl hydrocarbon 受容体(AhR)など)の発現がみられ、後者には酸化ストレスに対する造血維持センサー機能が見出されるなど、生体異物相互作用の中心舞台になっている。ここに幹細胞、とりわけ造血幹細胞と、これを支えるニッチを対象とした、幹細胞病理学研究的意義が浮かび上がってくる。本研究は、この視点から、造血幹細胞とこれを支えるニッチの機能を、生命活動維持の生理面と生体障害の場としての病理機構の面から明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

実験動物：酸化ストレス消去分子として知られるTrx過剰発現(Tg)マウスやヘテロKOマウス(ホモKOマウスは胎生致死/Tgマウス、KOマウスともに京大・淀井淳司教授由来)を野生型と比較することで、定常状態における酸化ストレス状態の差異やそれに基づく遺伝子発現の差異などを解析することを計画した。更に、幹細胞の維持に関わることを示してきたCx32やアリアルハイドロカーボン受容体(AhR)についても、それぞれのホモKOマウス(Cx32KOマウス; Bonn大 Klaus Willecke教授由来/AhRKOマウス; 筑波大・藤井義明教授由来)との比較を計画した。

造血幹・前駆細胞の分画採取：造血幹・前駆

細胞として分化抗原陰性、c-kit 陽性、Sca1 陽性(LKS)分画を対象とした。骨髓細胞から密度勾配法や、分化抗原抗体を認識する磁気ビーズによる陰性選別後、セルソータによって分離することで採取することとした。

発現遺伝子解析:抽出したRNAにより reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ないしは real time PCR による解析などを行うこととした。また、網羅的遺伝子発現解析 (Mouse Genome 430 2.0 array [Affymetrix])についても、一部の検体による解析を試みた。

発現遺伝子のデータマイニング:網羅的遺伝子発現の解析に当たっては、系統間相互に共通して発現する遺伝子や系統独自に発現する遺伝子群を念頭におき、それぞれにおける発現強度に基づく有意差による群共通に特異的な遺伝子発現プロファイル (common gene expression profile) と、群毎のマウス個別の確率論的な遺伝子発現プロファイル (stochastic gene expression profile) とを念頭において、両面からの解析を試行した。遺伝子リストの抽出手段として SPSS®, GeneSpring GX 7.3.1, Microsoft office excel 2007 などを利用して、前者については Welch-T 検定、後者については主要因解析を用い、得られた遺伝子リストについて Ingenuity Pathway Analysis (IPA、Ingenuity® Systems, Redwood City, CA) や KeyMolnet Light ver.5.3 (Institute of Medicinal Molecular Design, Inc. Tokyo, Japan)などの既存のデータベースを利用した gene ontology や、pathway analysis などによる解析を行うこととした。

活性酸素種 (ROS) の計測:細胞内 ROS の指標として蛍光色素 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) のほか、自己酸化が少ないことで知られる aminophenyl fluorescein (APF)及びhydroxyphenyl fluorescein (HPF)なども適宜利用して細胞内 ROS の計測を行うこととした。また、ミトコンドリアの膜電位の指標として、tetraphenyl phosphonium (TPP+) や safranin O などによる計測や、tetramethylrhodamine methylester (TMEM) 5,5',6,6'-tetrachloro-1, 1',3,3'-tetra-ethyl-benzimidazo carbocyanine iodide (JC-1)などの蛍光色素を用いたセルソータ解析を併行して進めた。

造血幹・前駆細胞の細胞動態解析 (BUUV 法; Hirabayashi et al. 2002; *ibid* 1998):プロモデオキシユリジン(BrdUrd)の持続投与と、BrdUrd 取り込み細胞の紫外線高感受性を利用した purging による造血幹・前駆細胞由来のコロニー数の減少率をもって、個体内造血幹細胞動態を測定する方法を用いることとした。

4. 研究成果

目的に即して、(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、及び、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的ストレス蓄積過程としての加齢・老化に伴う変化、の3点について研究を行い、以下の様な成果を得た。

(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: LKS分画のうち造血ニッチとの接着を維持する β 2-integrin (CD49)高発現分画は、ニッチにおける酸素分圧の勾配を想定させる比較的低酸素状態のチオレドキシン(Trx)過剰発現マウスでの分画から、野生型、Trx欠乏状態のマウスと、酸化的ストレスの増加に従って、2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetateで検出される細胞内活性酸素種量を反映する蛍光強度の高い亜分画の増大が認められた。

セルソータによって得られる骨髓細胞の未分化な造血幹細胞として、分化抗原(Lin)陰性、c-Kit及びSca-1陽性のLKS分画を用いた検討を進めてきたが、LKS分画外に長期移植能力を有する幹細胞分画が存在することが示唆される結果を得た。即ち、移植LKS分画由来の末梢血の出現頻度が270日後には低下することを見出したが、全骨髓細胞による移植ではこの頻度は維持される。また文献的にもLKS分画外の幹細胞の存在が示唆されている。そこで、Lin陰性分画をc-Kit及びSca-1の染色輝度で4分割したところ、c-Kit陰性Sca-1陽性分画は比較的単一の大きさに分布し、細胞内活性酸素種 (ROS) を蛍光色素で測定するとLKS分画より蛍光輝度が低いことが明らかとなった。そこでこの分画を含め、LKS分画以外の分画に、より未分化な幹細胞が存在することを作業仮説として検討を進めたが、明らかな他の分画を同定するには至らなかった。尚、経過中、骨髓内ではLKS分画由来細胞が維持され、コロニー形成能を持つ細胞の90%以上を占めたものの、末梢血球への分化は、個々の骨髓再建個体毎に大きく異なることが見出された(図1)。幹細胞の分化段階に応じた機能的に異なる造血支持環境、所謂ニッチが存在する可能性や、骨髓再建の際の全身照射による障害の遺残の差異、などが示唆される知見と考えられた。

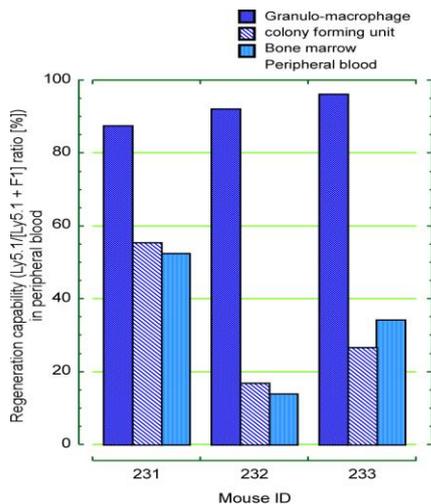


図1 培養性前駆細胞 (GM-CFU: ■)、骨髄 (■) 及び末梢血 (■)、を指標とした LKS 由来細胞の造血細胞の再建能 (Ly5.1/[Ly5.1+(Ly5.1/Ly5.2)F1] ratio [%])

(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: 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経時的に急速に拡大した。また、培養性コロニー形成細胞や脾コロニー形成細胞の静止期分画は、BrdUrd の持続標識によって、8 週齢以降 18 ヶ月齢まで減少することなく維持されることを明らかにしているが、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。従って、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の成立がなされるのに対して、より未分化な LKS 分画では 8 週齢以降に遅れる可能性が示唆された。

野生型マウスでは、培養性コロニー形成細胞や脾コロニー形成細胞の静止期分画は、BrdUrd の持続標識によって、8 週齢以降 18 ヶ月齢まで減少することなく維持されることが明らかであった。一方、多環芳香族炭化水素受容体 (AhR) 遺伝子の欠失マウスの解析から、AhR が未分化幹細胞分画の維持に寄与していることを示してきた。そこで AhR 欠失マウスでは、静止期分画が経時的に縮小し続けるのか、あるいは野生型よりは縮小したままで長期に維持されるのかが注目された。3 ヶ月の持続標識の結果から、より未分化な脾コロニー形成性前駆細胞では後者の傾向が、他方、培養性コロニー形成性の前駆細胞では前者の傾向が示され、静止期維持機構は分化に伴い変遷するものと考えられた。今後さらにこれらの進展について検証を続ける必要がある。

表 1. 定常状態における各種造血前駆細胞の細胞動態: 分化した培養性前駆細胞 (GM) から、より未分化な脾コロニー形成性前駆細胞 (S9, S13) への分化に伴う変化の傾向は老若で維持されており、両者での違いは S13 における cycling fraction の大きさが、若齢個体比べて加齢個体で有意に縮小することにある。即ち、加齢個体で dormant fraction が拡大する。

Young (3M-old)	GM	S9	S13
Percent of kill at day zero	10.8	~ 11.2	≥ 5.3
Doubling time (h)	47.1	≥ 42.8	≥ 34.5
Cycling fraction (%)	39.4	> 30.5	> 22.8

Old (23M-old)	GM	S9	S13
Percent of kill at day zero	8.2	~ 10.0	≥ 6.5
Doubling time (h)	46.5	≥ 42.1	≥ 39.1
Cycling fraction (%)	30.6	≥ 28.7	>> 12.2

(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的ストレス蓄積過程としての加齢・老化に伴う変化: 21 ヶ月齢マウスでの前駆細胞分画の細胞動態解析を行い、分化型前駆細胞では、2 ヶ月齢マウスとの差異は乏しいものの、未分化型前駆細胞では、2 ヶ月齢マウスに比べて、倍加時間が延長し、dormant fraction も大きい (表 1) という、これまでの文献的あるいは実験的データから示唆されている予備能力としての造血活性の抑制状態にあることが伺われる結果が得られた。更に、この分子背景として、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、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抑制されていることを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 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 5 6 件)

1. Hirabayashi Y, Li GX, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Inoue T: Comparison of microarray gene expression profiles corresponding to xenobiotic responses to oxidative stresses induced by ionizing radiation and benzene treatment. Society of Toxicology 51st Annual Meeting & ToxExpo (2012.3.14) San Francisco, CA, USA
2. Hirabayashi Y, Yoon B-I, Li G-X, Igarashi K, Ogawa Y, Kanno J, Yodoi J, Inoue T. A comparison of microarray gene expressions at leukemogenic doses between ionizing radiation and benzene exposure. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.15) 横浜
3. Hirabayashi Y, Yoon B-I, Li G-X, Igarashi K, Fujii-Kuriyama Y, Kanno J. A hematopoietic stem-cell-specific aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated benzene-induced adverse effect. 第 70 回日本癌学会総会 (2011.10.4) 名古屋
4. 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.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, 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 3 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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

井上 達 (INOUE TOHRU)
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・客員研究員
研究者番号: 50100110