

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790925

研究課題名(和文)

HIF-1/VHL 制御系による造血幹細胞維持機構の解明と幹細胞増幅

研究課題名(英文)

Molecular mechanisms for hematopoietic stem cells by HIF-1/VHL regulatory system

研究代表者

田久保 圭誉 (TAKUBO KEIYO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50502788

研究成果の概要(和文): 造血幹細胞(HSC)はニッチと呼ばれる特殊な微小環境で維持される。本課題では HSC は骨髄内骨膜近傍領域において低酸素状態で細胞周期を静止期にとどめていることを見出した。また、こうした性質の維持のためには低酸素応答因子 HIF-1 α とその蛋白を破壊するために必要な E3 ユビキチンリガーゼ VHL が必須であり、HIF-1 α が失われると HSC は老化してストレス耐性を失った。一方、VHL 欠損で HSC の細胞周期がより静止状態になったことから、HIF-1/VHL 制御系の精密な制御は HSC 維持に必須であることが示された。

研究成果の概要(英文): Hematopoietic stem cells (HSCs) are sustained in a specific microenvironment known as the stem cell niche. Mammalian HSCs are kept quiescent in the endosteal niche, a hypoxic zone of the bone marrow (BM). We found that normal HSCs maintain intracellular hypoxia and stabilize hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein. In HIF-1 α deficient mice, the HSCs lost their cell cycle quiescence and HSC numbers decreased during various stress settings including bone marrow transplantation, myelosuppression, or aging, in a p16Ink4a/p19Arf-dependent manner. Overstabilization of HIF-1 α by biallelic loss of an E3 ubiquitin ligase for HIF-1 α (VHL) induced cell cycle quiescence in HSCs and their progenitors but resulted in an impairment in transplantation capacity. In contrast, monoallelic loss of VHL induced cell cycle quiescence and improved BM engraftment during bone marrow transplantation. These data indicate that HSCs maintain cell cycle quiescence through the precise regulation of HIF-1 α levels.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：血液学、幹細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、低酸素、静止期、老化

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は各臓器システムの中で自己複製能と多分化能を持つ細胞集団である。臓器機能再生のための有望な細胞ソースであるとともに、腫瘍化・老化の作用点となる細胞群として、その増殖・維持・分化の分子基盤の完全

な解明が熱望されている。幹細胞の中でも造血幹細胞は初めにその存在が同定され、臨床応用も幹細胞集団を含む骨髄移植によって最初に行われている。成体骨髄では造血幹細胞は細胞周期が静止状態にある。細胞周期が亢進した造血幹細胞は白血病化の要因とな

るため、造血幹細胞の細胞周期の抑制的制御メカニズムは腫瘍化の抑制に必須である。研究開始当初の時点で研究代表者を含むグループによって造血幹細胞の細胞周期制御の分子基盤の一端が明らかにされてきていた。その結果、(1)造血幹細胞は内骨膜近傍領域で周囲のニッチ細胞からのシグナルで静止期にあること、(2)活性酸素種曝露に対して脆弱で、最終的に枯渇することが明らかになった。こうした観察は『造血幹細胞が活性酸素の少ない低酸素環境で、それを利用して細胞周期を抑制的に制御している』と考えたと統合された理論として諒解できる。以前より造血幹細胞存在領域は低酸素環境であると想像されてきており、研究代表者らは骨髄で1年近くの長期にわたって細胞分裂をしない細胞集団は低酸素状態にあることを見出して報告していたがその分子機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では低酸素応答機構のマスター経路として知られる HIF-1-VHL 制御系を切り口にこの造血幹細胞が低酸素環境を利用して特定の分子機構を駆動して自らの維持を図っているという仮説の妥当性を詳細に検討し、低酸素環境にある造血幹細胞の分子制御メカニズムを検証した。具体的には以下の2項目を目的とした。

- (1) HIF-1-VHL 制御系による造血幹細胞制御機構の詳細な同定
- (2) 同定した低酸素応答機構に基づき低酸素ニッチを再構築し、造血幹細胞の体外維持と増幅

3. 研究の方法

(1) Mx1-Cre:HIF-1αflox/flox および Mx1-Cre:VHLflox/flox マウス由来の一般的な血液学的解析(末梢血血算、CFU-C、LTC-IC、CFU-S等)を行った。この際、幹細胞機能不全の結果としての幹細胞集団の枯渇や末梢血異常は高齢にならないと捉えられない可能性があるため、経時変化や寿命についても注意して追跡した。特に、Mx1-Cre:VHLflox/flox マウスは誘導的に VHL 遺伝子を欠失するとマウスが致死である事を認めているため、野生型マウスの骨髄を移植によって Mx1-Cre:VHLflox/flox マウス由来の骨髄で置き換えたマウスを作成し、解析に供した。また、VHL ヘテロ欠損マウスの解析も行った。

(2) Mx1-Cre:HIF-1αflox/flox および Mx1-Cre:VHLflox/flox マウスの造血幹細胞の解析を行った。また、連続骨髄移植後の生着率の検討を行うことで幹細胞寿命の変化

を評価した。

(3) Mx1-Cre:HIF-1αflox/flox および Mx1-Cre:VHLflox/flox マウスの造血幹細胞と骨髄内の微小環境の形態学的解析を行った。特に、当研究室が得意とするタンゲステンプレートを用いた新鮮骨切片を用いて、正確な形態学的評価を行った。

(4) Mx1-Cre:HIF-1αflox/flox および Mx1-Cre:VHLflox/flox マウスの造血幹細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現変動を同定した。得られた結果を定量 RT-PCR で確認し、in vivo で HIF-1α 蛋白量を変動させた結果起こる幹細胞機能変化の責任遺伝子を同定した。

(5) ex vivo において低酸素培養が野生型、HIF-1α 欠損、あるいは VHL 欠損造血幹細胞に及ぼす影響を FACS と骨髄移植によって検討した。

(6) HIF-1α 欠失によって幹細胞だけでなく HIF-1α 欠損骨髄ニッチ細胞側にも異常が起こっている可能性を調べるために、Mx1-Cre:HIF-1αflox/flox および Mx1-Cre:VHLflox/flox マウスに対して正常造血幹細胞を移植し、異常の有無を検索した。

(7) HIF-1α 制御系によって発現が調節される遺伝子群を指標にして、低酸素骨髄環境を模擬的に再現できる造血幹細胞培養系を確立し、この系を用いて長期骨髄再建能を持つ造血幹細胞の増幅の可否を検討した。また、酸素濃度変化に加えて、HIF-1 活性化剤によって低分子化合物を用いた幹細胞の維持・増幅も検討した。

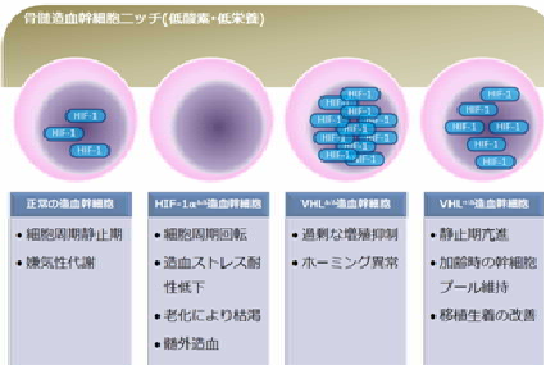
4. 研究成果

本研究期間における詳細な解析で、未分化な造血幹・前駆細胞分画は低酸素状態で、低酸素応答の中心的制御因子 HIF-1α が高発現していることを見いだした。HIF-1α 蛋白は低酸素分圧下で安定化し、低酸素適応関連分子群の転写活性化を行う。通常の酸素分圧下では HIF-1α の ODD ドメインのプロリン残基はプロリン水酸化酵素 Phd1~3 によって水酸化プロリン残基になり、E3 ユビキチンリガーゼ VHL に認識されてユビキチン・プロテアソーム系で分解され安定化できない。これら Phd/VHL/HIF-1α 制御系は個体の低酸素応答の中心をなす。

本研究における検討から、HIF-1α を欠損した造血幹細胞は G0 期から離脱して、造血ストレス感受性が亢進し、老化して失われることを見出した。対照的に VHL ホモあるいはヘテロ欠損で HIF-1α を増加させると造

血幹細胞は細胞周期を静止期化したため、HIF-1 α 量が造血幹細胞の細胞周期を精密に調節していると考えられた。この際、VHLホモ欠損では細胞周期の完全停止により幹細胞活性が失われるが、ヘテロ欠損では野生型よりも幹細胞活性が上昇し、ストレス耐性も上昇していた。すなわち VHL/HIF-1 α 制御系の精密な制御は正常造血幹細胞の維持に必須であることを明らかにすることができた(図1)。

図1: HIF-1 α による造血幹細胞維持機構



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. Kinoshita T, Nagamatsu G, Kosaka T, Takubo K, Hotta A, Ellis J, Suda T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 6. [Epub ahead of print] 査読有

Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere independent mechanism. Nitta E, Yamashita M, Hosokawa K, Xian M, Takubo K, Arai F, Nakada S, Suda T. *Blood*. 2011 Feb 4. [Epub ahead of print] 査読有

A germ cell specific gene, Prmt5 works as somatic cell reprogramming. Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T. *J Biol Chem*. 2011 Jan 26. [Epub ahead of print] 査読有

Hemp, an mbt domain-containing protein,

plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation. Honda H*, Takubo K*, Oda H, Kosaki K, Tazaki T, Yamasaki N, Miyazaki K, Moore KA, Honda Z, Suda T, Lemischka IR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2468-73. Epub 2011 Jan 20. (*These authors contributed equally to this work.) 査読有

Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α ; overexpression. Iriuchishima H*, Takubo K*, Matsuoka S, Onoyama I, Nakayama KI, Nojima Y, Suda T. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2373-7. Epub 2010 Dec 29. (*These authors contributed equally to this work. K.T. is a corresponding author of this paper.) 査読有

Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. *Cell Stem Cell*. 2010 Sep 3;7(3):391-402. (K.T. is a corresponding author of this paper.) 査読有

Acquisition of G state by CD34 positive cord blood cells after bone marrow transplantation. Shima H, Takubo K, Tago N, Iwasaki H, Arai F, Takahashi T, Suda T. *Exp Hematol*. 2010 Dec;38(12):1231-40. Epub 2010 Aug 26. (K.T. is a corresponding author of this paper.) 査読有

von Hippel-Lindau protein regulates transition from the fetal to the adult circulatory system in retina. Kurihara T, Kubota Y, Ozawa Y, Takubo K, Noda K, Simon MC, Johnson RS, Suematsu M, Tsubota K, Ishida S, Goda N, Suda T, Okano H. *Development*. 2010 May;137(9):1563-71. 査読有

Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura Y, Gomei Y, Takubo K, Shiama H, Matsuoka S, Li L, Suda T. *Cell Stem Cell*. 2010 Mar 5;6(3):194-8. 査

読有

M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. J Exp Med. 2009 May 11;206(5):1089-102. Epub 2009 Apr 27. 査読有

Craniofacial malformation in R-spondin2 knockout mice. Yamada W, Nagao K, Horikoshi K, Fujikura A, Ikeda E, Inagaki Y, Kakitani M, Tomizuka K, Miyazaki H, Suda T, Takubo K. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 10;381(3):453-8. Epub 2009 Feb 20. (K.T. is a corresponding author of this paper.) 査読有

〔学会発表〕(計9件)

Takubo K. Anaerobic Metabolism Maintains Quiescence of Hematopoietic Stem Cell USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, Hayama, Japan, February 25, 2011

田久保圭誉, 入内島裕乃, 須田年生 Pdk-mediated Modulation of Cell Cycle of Long-Term Hematopoietic Stem Cells 第8回がんとハイポキシア研究会(札幌) 2011年1月29日

Takubo K, Nagamatsu G, Iriuchishima H, Ishikawa C and Suda T. Purification analysis of testicular germ line and somatic subpopulations. International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells 2010年11月22日(福岡)

田久保圭誉, 須田年生 VHL/HIF-1 制御系による造血幹細胞の恒常性維持機構「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」第3回公開シンポジウム(東京) 2010年10月21日

Takubo K, Iriuchishima H, Yamada W, Miyakawa Y, Miyamoto T, Suda T. Suppressor Effect of Novel Antitumor Drug, Bendamustine on Multiple Myeloma in Humanized Mouse Model 第72回日本血液学会学術集会(横浜) 2010年9月25日

Takubo K. Regulation of "stemness"

by Hypoxic Bone Marrow Microenvironment 第69回日本癌学会学術総会(大阪) 2010年9月22日

田久保圭誉 低酸素応答シグナルによる造血幹細胞の維持 第31回日本炎症・再生医学会(東京・新宿)ミニシンポジウム5「幹細胞と老化、ストレス」 2010年8月6日

田久保圭誉, 須田年生 マウス未分化型精原細胞特異的遺伝子群のプロモーター解析「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第2回公開シンポジウム 2009年11月26-27日(品川・コクヨホール)

Takubo K. A Protective Program for Hematopoietic Stem Cells by Anaerobic Metabolism 第71回日本血液学会学術集会(京都)シンポジウム5 "Hematopoietic Stem Cell Niche" 2009年10月24日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/cellldiff/taisya.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
田久保 圭誉 (TAKUBO KEIYO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 50502788

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし