

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19549

研究課題名（和文）造血幹細胞のサイトカイン応答を規定するクロマチン動態変化の制御

研究課題名（英文）The regulation of cytokine response in hematopoietic stem cells

研究代表者

梅本 晃正（Umemoto, Terumasa）

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：50620225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞はしばしば、サイトカイン応答において、相反する応答を示すことが知られているが、その際の幹細胞がサイトカインの応答性をどのように決定しているかに関して不明な点が多い。本研究では、造血幹細胞の代謝がクロマチン動態を制御することで、サイトカインの応答性に影響を及ぼしているとの仮説の下、特にグルタミン代謝に着目し、中でもGluをKGに異化するGlud1が造血幹細胞のクロマチン動態の制御を介して、サイトカイン応答性を制御していることを示唆する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、造血幹細胞において相反する2面的効果を示すサイトカインに対する応答の様式決定において、代謝制御、特にグルタミン代謝が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。グルタミン代謝は盛んに分裂する細胞でみられる普遍的な代謝であることから、特に分裂誘導時におけるサイトカイン応答制御の理解という観点においては、その波及効果は造血幹細胞に留まらないと期待される。また、造血幹細胞の運命制御の理解が深まることで、再生治療・遺伝子治療を視野に入れた試験管内における幹細胞操作方法の開発や、抗癌剤投与の副作用として知られている骨髄抑制に対する新規の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs) often showed differential responses to same cytokine stimulations, but it remains unclear how HSCs determine the response to the cytokine stimulation. In this study, we hypothesized that the metabolic regulation is involved in the determination of cytokine responses via altering chromatin status. In this context, we focused on glutamine metabolism and suggest the possibility that Glud1, which is an enzyme catabolizing from Glu to KG, is involved in the regulation of cytokine regulation via modulating chromatin status.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

血液細胞の源である造血幹細胞は通常、骨髄中において低いミトコンドリア代謝下にて静止状態で維持されている。一方、抗がん剤治療や放射線治療等の副作用によって骨髄抑制が誘導された後、並びに骨髄移植後などの骨髄造血再生期においては、造血幹細胞は「自らを増幅する能力(自己複製能)」と「全ての血液細胞へと変化する能力(多分化能)」を駆使して、骨髄造血組織の再構築を主導すると考えられている。昨今、幹細胞の自己複製・分化の制御に関わる様々な因子が明らかにされてきているが、造血幹細胞の運命制御機構に関しては未だ不明な点が多い。その例として、造血幹細胞におけるトロンボポイエチン(TPO)やStem cell factor(SCF)等のサイトカインに対する応答が挙げられる。TPOは巨核球への、SCFは肥満細胞への分化を誘導するが、どちらのサイトカインも幹細胞の自己複製分裂も誘導する。しかしながら、造血幹細胞がどのように、これら相反する2面性を持つサイトカインの効果を選択する機構に関しては未だに不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者は造血幹細胞のTPO刺激下でのJAK-STAT経路活性化の“促進”は造血幹細胞の分裂を促進する一方、新たに生み出される細胞の運命への影響は限定的である可能性を見出している。さらに、申請者は骨髄組織再生期の造血幹細胞の研究を通して、クロマチン動態の変化こそが造血幹細胞の運命制御の本質であるとの仮説に至った(Umemoto et al, *J Exp Med*, 2018; Umemoto et al, *EMBO J*, 2022)。従って、申請者は造血幹細胞のTPOに対する応答はサイトカインシグナル制御よりむしろ、幹細胞が有するクロマチン動態によって既定されていると考え、本研究では「造血幹細胞のサイトカインの応答性を既定するクロマチン動態の制御機構」を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

申請者は準備実験において、造血幹細胞マーカーであるEndothelial protein C receptor(EPCR)を特に高く発現する造血幹細胞(EPCR強陽性幹細胞)はEPCR弱陽性幹細胞と比較して、骨髄組織再生能(幹細胞機能)が顕著に高く、異なるクロマチン動態を示すことを確認している(図1A)。

重要なことに、EPCR強陽性幹細胞をTPO存在下で培養した時は幹細胞表現系を比較的維持するが、弱陽性幹細胞は分化マーカーであるCD48が陽性の細胞(前駆細胞)へ分化した(図1B)。さらに、EPCR弱陽性幹細胞は強陽性幹細胞より、CD48遺伝子座において「STAT5の結合領域を含むエンハンサー」のアクセシビリティが顕著に高かった(図1C)。

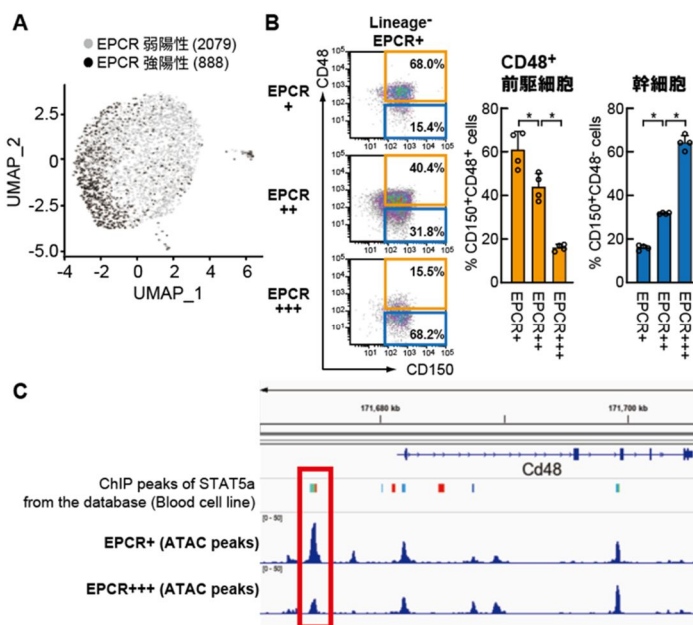


図1: 造血幹細胞亜集団が示すTPO応答の多様性

- A: シングルセル ATAC-seq で示される EPCR 強陽性と弱陽性幹細胞のクロマチン動態の相違
- B: TPO 存在下における EPCR 強陽性(EPCR+++ )と弱陽性幹細胞 (EPCR+ )の異なる応答
- C: CD48 遺伝子座のアクセシビリティと STAT5 結合領域

#### 項目 1: クロマチン動態の変化を伴った EPCR 弱陽性幹細胞の産生

EPCR 強陽性幹細胞は弱陽性細胞と異なり、TPO 存在下での培養後に EPCR 強陽性細胞と弱陽性細胞の両幹細胞亜集団を産生する(図2左)。重要なことに、*in vitro* で新たに産生された両幹細胞亜集団もまた *in vivo* 由来時と同様に、異なる TPO 応答性を再現する(図1B,3右)。従

って、*in vivo* 由来の両幹細胞亜集団間で確認されたクロマチン動態の差が、*in vitro* で新たに形成された両亜集団間でも再現されるかを検証する。

### 項目 2: クロマチン動態変化の誘導因子

申請者は準備実験にて、EPCR 強陽性幹細胞を低グルタミン条件下で培養すると EPCR 弱陽性幹細胞の産生が抑制され、EPCR 強陽性の表現型が維持されることを確認している。従って、グルタミン代謝制御の視点から、EPCR 強陽性表現型維持、即ちクロマチン動態維持に関わる因子を同定する。

#### 4. 研究成果

EPCR 強陽性幹細胞を4日間通常培養条件下で培養した後、産生された EPCR 強陽性幹細胞と EPCR 弱陽性幹細胞を分取して、RNA-seq 並びに ATAC-seq にて遺伝子発現パターンとクロマチン動態を検討した。その結果、4日間培養で生み出された EPCR 強陽性幹細胞は EPCR 弱陽性幹細胞とは明確に区別できる遺伝子発現パターン、そしてクロマチン動態を示していた(図3)。また、その差異の一部は *in vivo* 由来の両幹細胞亜集団間においても共通してみられるものであった。これらから、EPCR 強陽性幹細胞が EPCR 弱陽性幹細胞を生み出すときはクロマチン動態の変化を伴っていることが強く示唆された。

さらに、グルタミン代謝経路中においてグルタミン酸が KG(  $\alpha$ -ketoglutarate)に異化される反応に着目し、それを媒介するアミノトランスフェラーゼ(Got1, Got2等)とグルタミン脱水素酵素(Glut1)に着目し、それらの阻害剤存在下で EPCR 強陽性幹細胞を培養したところ、Glut1 阻害剤存在下でのみ、EPCR 強陽性幹細胞が顕著に維持されることがわかった。さらに、Glut1 阻害剤で維持された EPCR 強陽性幹細胞は、通常培養条件下で維持された EPCR 強陽性幹細胞とほぼ同等の遺伝子発現パターンとクロマチン動態を示した。これらから、グルタミン代謝、特に Glut1 を介したグルタミン脱水素反応が EPCR 強陽性幹細胞のクロマチン動態制御のカギを握っている可能性が示唆された。

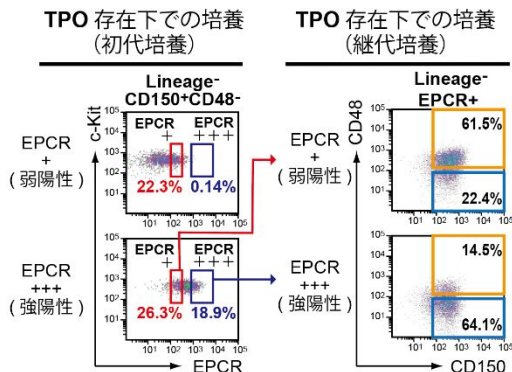


図2: EPCR 強陽性幹細胞から産生された幹細胞亜集団による TPO 応答の多様性の再現

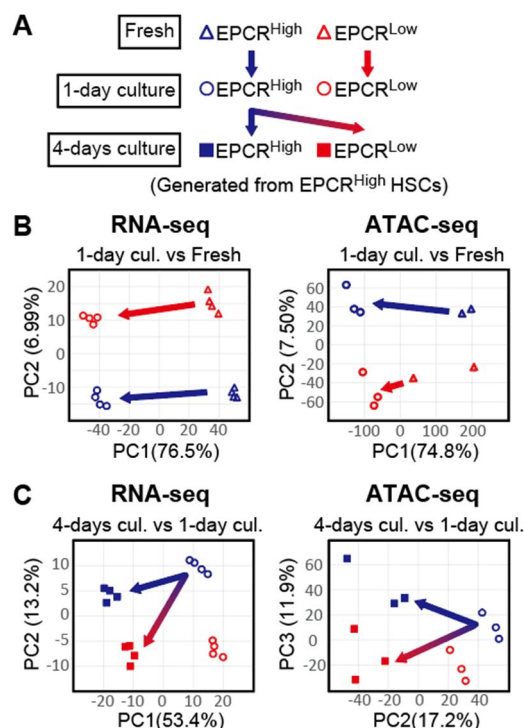


図3: EPCR 強陽性幹細胞から産生された幹細胞亜集団による遺伝子発現パターンとクロマチン動態

A: 実験モデル。未培養、1日培養、4日培養後の EPCR 強陽性幹細胞および EPCR 弱陽性幹細胞の遺伝子発現パターンとクロマチン動態検討した。

B and C: 未培養 vs 1日培養後 (B) および 1日培養後 vs 4日培養後 (C) の EPCR 強陽性幹細胞および EPCR 弱陽性幹細胞における遺伝子発現(左)およびクロマチン動態(右)の PCA プロット。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Takahara Yuji, Higaki Takumi, Yokomizo Tomomasa, Umemoto Terumasa, Ariyoshi Kazunori, Hashimoto Michihiro, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Inoue Toshihiro, Suda Toshio, Mizuno Hidenobu | 4. 巻<br>5       |
| 2. 論文標題<br>Bone marrow imaging reveals the migration dynamics of neonatal hematopoietic stem cells   | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-022-03733-x  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ma Wenjuan, Ahmad Shah Adil Ishtiyah, Hashimoto Michihiro, Khalilnezhad Ahad, Kataoka Miho, Arima Yuichiro, Tanaka Yosuke, Yanagi Shigeru, Umemoto Terumasa, Suda Toshio | 4. 巻<br>43              |
| 2. 論文標題<br>MITOL deficiency triggers hematopoietic stem cell apoptosis via ER stress response  | 5. 発行年<br>2024年         |
| 3. 雑誌名<br>The EMBO Journal   | 6. 最初と最後の頁<br>339 ~ 361 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s44318-024-00029-0  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>梅本晃正、須田年生                        |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリア代謝とクロマチン動態に基づいた造血幹細胞の制御機構 |
| 3. 学会等名<br>第84回日本血液学会学術集会                   |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Terumasa Umemoto, Alban Johansson, Shah Adil Ishtiyah Ahmad, Michihiro Hashimoto, Sho Kubota, Kenta Kikuchi, Haruki Odaka, Takumi Era, Daisuke Kurotaki, Goro Sashida, Toshio Suda |
| 2. 発表標題<br>ACLY-dependent coupling of metabolic state and chromatin accessibility regulates hematopoietic stem cell functions during bone marrow regeneration                                 |
| 3. 学会等名<br>第19回幹細胞シンポジウム  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>梅本 晃正                     |
| 2. 発表標題<br>骨髓造血再生期に学ぶ造血幹細胞の 自己複製誘導機構 |
| 3. 学会等名<br>第23回日本再生医療学会総会（招待講演）      |
| 4. 発表年<br>2024年                      |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                 |              |               |
|---------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>培地、製造方法、及び細胞製剤      | 発明者<br>梅本晃正  | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2023-007156 | 出願年<br>2023年 | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |  |  |
|---------|---------|--|--|
|         |         |  |  |