

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19550

研究課題名（和文）単一造血幹細胞のATP濃度・量のリアルタイム測定技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of real-time measurement technique for ATP concentration and amount in single hematopoietic stem cells

研究代表者

田久保 圭誉（Takubo, Keiyo）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・生体恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

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）：本研究は、ATPバイオセンサーを用いて、造血幹細胞の単一細胞レベルでのATP濃度をリアルタイムに測定する技術を確立した。引き続き、これらの技術を活用して、ATP濃度の変動が幹細胞の運命決定や細胞動態にどのように影響するかを詳細に解析した。その結果、造血幹細胞が急性ストレスに直面すると、ATPの産生源として嫌氣的解糖を迅速に活性化することを発見した。具体的には、増殖ストレス下ではアルギニンメチル基転移酵素PRMT1がPFKFB3をメチル化し、ミトコンドリアストレス下ではAMPKがPFKFB3をリン酸化することにより解糖系を活性化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、造血幹細胞のATP濃度をリアルタイムで測定する新たな技術を確立し、代謝と幹細胞性の関係を明らかにした点にある。特に、急性ストレスがATP産生経路に与える影響を分子レベルで解明することで、代謝の可塑性が幹細胞の運命決定に果たす役割を示した。社会的意義としては、血液疾患や再生医療の分野において、造血幹細胞の代謝制御が新たな治療法の開発につながる可能性を示唆している。また、本研究で確立された技術は、他の細胞種の代謝研究にも応用可能であり、広範な生物医学研究の基盤技術として社会に貢献することが見込まれる。

研究成果の概要（英文）：This study established a technique to measure ATP concentrations at the single cell level of hematopoietic stem cells in real time using an ATP biosensor. We then used these technologies to analyze in detail how fluctuations in ATP concentration affect stem cell fate determination and cellular dynamics. We found that when HSCs are exposed to acute stress, the source of ATP production rapidly activates the anaerobic glycolytic system. Specifically, they found that under proliferative stress, arginine methyltransferase PRMT1 methylates PFKFB3, and under mitochondrial stress, AMPK phosphorylates PFKFB3 to activate the glycolytic system.

研究分野：血液学・幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 骨髄 幹細胞ニッチ 幹細胞代謝 解糖系

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が生存しながら各種のイベント(運動・増殖・分化等)を実行する際には、エネルギー通貨である ATP が消費される。すなわち、細胞活動の維持のためには ATP の適切な産生・消費のバランスが保たれることが肝要である。近年、エネルギー代謝バランスが組織幹細胞の運命決定に重要であることが知られるようになり、「幹細胞代謝学」という新たな融合領域が勃興している。研究代表者はこれと軌を一にして、骨髄に住まう造血幹細胞を制御する微小環境(ニッチ)因子として、骨髄内の低い酸素分圧が重要で、エネルギー代謝調節を通じて幹細胞性を維持し造血恒常性を保つことを報告してきた。こうした研究の次のステップとして、造血幹細胞の単一細胞リアルタイム ATP 濃度解析技術を開発することで幹細胞代謝学を次の次元へと押し上げる必要が生じていた。これまでの、研究代表者自身のも含む既存の幹細胞代謝研究においては、特定の代謝酵素のノックアウトマウス由来の幹細胞の解析や、組織細胞から抽出した ATP を含む各種代謝物「量」のプロファイリングが中心的な研究手法であった。これらに基づいて代謝経路や代謝物の組織幹細胞制御における意義や機能の解析が進んできた。しかし、これら既存研究手法には技術的な限界があり、代謝経路に特有の高度の可塑性や、各細胞の代謝物量の個性やばらつきは無視される。また、測定によって細胞は溶解されて失われるため、代謝物の時間変化は計測できない。スループット性や感度も低く、造血幹細胞のように希少な細胞分画の解析は困難である。さらに、代謝物は細胞内の「濃度」が重要であるが、造血幹細胞内の ATP 濃度は全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ATP バイオセンサー搭載造血幹細胞を用いた、単一造血幹細胞の ATP 濃度・量のリアルタイム測定技術を確立して、この問いに答えることを目的とした。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、本研究では下記 4 項目の研究を実施して、造血幹細胞の ATP 濃度の多様性や制御機構を解明するための造血幹細胞の単一細胞リアルタイム ATP 濃度リアルタイム解析技術を確立することとした。具体的にはまず、(i) 体外で ATP 濃度を維持する培養条件を確立し、(ii) ATP バイオセンサー搭載造血幹細胞による ATP 濃度・量の定量測定系を確立し、さらには (iii) 骨髄の造血幹細胞を含む各種細胞分画の ATP 濃度・量を明らかにした上で (iv) 造血幹細胞の ATP 濃度・量と細胞動態・運命との関連を解析することとした。

(i) 体外で ATP 濃度を維持する培養条件の確立：生きた造血幹細胞の ATP 濃度を測定するためには、体内同様の ATP 濃度を維持することが必要である。ところが、体外で通常の酸素分圧・血清濃度・サイトカイン濃度で造血幹細胞を培養すると、ATP が速やかに低下・枯渇することを見出した。研究代表者による造血幹細胞の代謝特性を維持する培養法(Cell Rep 2019)を参考に、培地の酸素分圧や代謝物等の条件を最適化することとした。培地に求められる一般的な諸条件以外の最適化も進めた。

(ii) ATP バイオセンサー搭載造血幹細胞による ATP 濃度・量の定量測定系の確立：ATP 濃度のリアルタイム測定のために、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 型の ATP バイオセンサー GO-ATeam2 を搭載した造血幹細胞を用いた。GO-ATeam2 はレシオメトリックで、センサー発現量に依存せずに ATP 濃度の測定が可能になる。(i) の条件で培養した骨髄細胞をフローサイトメーターで FRET 値を得て ATP 濃度に変換した。フローサイトメーターで細胞の大きさを測定し、細胞の体積を算出したうえで、単一細胞ごとの ATP 量も測定することとした。

(iii) 骨髄の造血幹細胞を含む各種細胞分画の ATP 濃度・量を明らかにする：これまで用意したフローサイトメーターによる ATP 濃度定量測定系を活用して、各種血液細胞分画の細胞内 ATP 濃度を求めることとした。ATP 量との関連や、集団内の多様性・亜集団の有無を検討した。

(iv) 造血幹細胞の ATP 濃度・量と細胞動態・運命との関連を解き明かす：本技術を利用して動態した造血幹細胞の代謝制御機構をもとに、造血幹細胞のエネルギー状態が幹細胞としての特性・機能・運命をいかに制御するか明らかにするための検討を実施した。

4. 研究成果

初年度は、技術開発の基盤となる体外で ATP 濃度を維持する培養条件の探索・同定を実施した。その過程においては、通常の造血幹細胞の培養条件では ATP 濃度が速やかに低下することを見出し、既存の造血幹細胞代謝研究の陥穽の存在が示唆された。また、この検討に基づいて、ATP バイオセンサー搭載造血幹細胞による ATP 濃度・量の定量測定系を確立するべく多様な測定条件を試行して、ある程度妥当性のある解析結果が得られる測定手法の確立に成功した。関連する培養プロトコルの確立にも努めた。

最終年度である第二年度は、前年度までに確立した単一造血幹細胞の ATP 濃度・量のリアルタイム測定技術を活用して急性のストレスが負荷された造血幹細胞の ATP 濃度の変化を検討し、責任となる代謝経路の同定に努めた。急性ストレスの中でも増殖ストレスとミトコンドリアスト

レスでは ATP の産生源が速やかに解糖系へシフトすることを同定した。この代謝可塑性の背景の分子基盤の解析を実施して、責任となる代謝学的な分子機構として解糖系の律速酵素 PFK のアロステリックな活性化因子である PFKFB3 を同定したうえで、当該経路関連酵素の阻害や過剰発現、ロックアウトを通じてストレス造血における必要性を確認した。特に、増殖ストレスによってアルギニンメチル基転移酵素 PRMT1 がメチル化を PFKFB3 に入力して活性化すること、ミトコンドリアストレスによって AMPK によってリン酸化を PFKFB3 に入力して活性化することが同定され、ストレスの種類に応じた重層的な代謝活性化機構が造血幹細胞に準備されていることが明示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Sorimachi Y, Kobayashi H, Shiozawa Y, Koide S, Nakato R, Shimizu Y, Okamura T, Shirahige K, Iwama A, Goda N, Takubo K, Takubo K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Mesenchymal loss of p53 alters stem cell capacity and models human soft tissue sarcoma traits.v	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1211-1226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2023.03.009	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 Shiroshita K, Kobayashi H, Takubo K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Evaluating the function of murine quiescent hematopoietic stem cells following non-homologous end joining-based genome editing.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protoc	6. 最初と最後の頁 102347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102347	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 Shiroshita K, Kobayashi H, Watanuki S, Karigane D, Sorimachi Y, Tamaki S, Haraguchi M, Yamamoto M, Nakamura-Ishizu A, Okamoto S, Kataoka K, Takubo K.	4. 巻 124
2. 論文標題 Distinct roles of the preparatory and payoff phases of glycolysis in hematopoietic stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 56-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2023.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Takubo K, Htun PW, Ueda T, Sera Y, Iwasaki M, Koizumi M, Shiroshita K, Kobayashi H, Haraguchi M, Watanuki S, Honda ZI, Yamasaki N, Nakamura-Ishizu A, Arai F, Motoyama N, Hatta T, Natsume T, Suda T, Honda H.	4. 巻 120
2. 論文標題 MBTD1 preserves adult hematopoietic stem cell pool size and function.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2206860120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2206860120	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 該当する

1. 著者名 Iga T, Kobayashi H, Kusumoto D, Sanosaka T, Fujita N, Tai-Nagara I, Ando T, Takahashi T, Matsuo K, Hozumi K, Ito K, Ema M, Miyamoto T, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H, Shibata S, Kohyama J, Kim KK, Takubo K, Kubota Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Spatial heterogeneity of bone marrow endothelial cells unveils a distinct subtype in the epiphysis.v	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Cell Biol	6. 最初と最後の頁 1415-1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01240-7	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 該当する

1. 著者名 Awazawa M, Matsushita M, Nomura I, Kobayashi N, Tamura-Nakano M, Sorimachi Y, Takubo K, Ueki K.	4. 巻 153
2. 論文標題 Imeglimin improves systemic metabolism by targeting brown adipose tissue and gut microbiota in obese model mice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 155796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2024.155796	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 Yahagi A, Mochizuki-Kashio M, Sorimachi Y, Takubo K, Nakamura-Ishizu A.	4. 巻 15-Mar
2. 論文標題 Abcb10 regulates murine hematopoietic stem cell potential and erythroid differentiation.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 104191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2024.104191	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 Watanuki S, Kobayashi H, Sugiura Y, Yamamoto M, Karigane D, Shiroshita K, Sorimachi Y, Fujita S, Morikawa T, Koide S, Oshima M, Nishiyama A, Murakami K, Haraguchi M, Tamaki S, Yamamoto T, Yabushita T, Tanaka Y, Nagamatsu G, Honda H, Okamoto S, Goda N, Tamura T, Nakamura-Ishizu A, Suematsu M, Iwama A, Suda T, Takubo K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Context-dependent modification of PFKFB3 in hematopoietic stem cells promotes anaerobic glycolysis and ensures stress hematopoiesis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 RP87674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.87674	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 該当する

1. 著者名 Fujita S, Morikawa T, Tamaki S, Sezaki M, Takizawa H, Okamoto S, Kataoka K, Takubo K.	4. 巻 112-113
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Sympathetic and Nociceptive Innervation Across Bone Marrow Regions in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 44-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.07.297	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kobayashi H, Watanuki S, Takubo K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Approaches towards Elucidating the Metabolic Program of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11203189	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 Sugawara S, Okada R, Loo TM, Tanaka H, Miyata K, Chiba M, Kawasaki H, Katoh K, Kaji S, Maezawa Y, Yokote K, Nakayama M, Oshima M, Nagao K, Obuse C, Nagayama S, Takubo K, Nakanishi A, Kanemaki MT, Hara E, Takahashi A.	4. 巻 5
2. 論文標題 RNaseH2A downregulation drives inflammatory gene expression via genomic DNA fragmentation in senescent and cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 1420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04369-7	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 Shiroshita K, Kobayashi H, Watanuki S, Karigane D, Sorimachi Y, Fujita S, Tamaki S, Haraguchi M, Itokawa N, Aoyama K, Koide S, Masamoto Y, Kobayashi K, Nakamura-Ishizu A, Kurokawa M, Iwama A, Okamoto S, Kataoka K, Takubo K.	4. 巻 2
2. 論文標題 A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep Methods	6. 最初と最後の頁 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100354	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 Ito K, Kise H, Suzuki S, Nagai S, Hachiya K, Takeda H, Kawabata S, Ikeda D, Takubo K, Kaneko S, Fujita N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Potential Involvement of Oxidative Stress in Ligamentum Flavum Hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12030808	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17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroschi Kobayashi, Shintaro Watanuki, Yusuke Shiozawa, Naoya Takayama, Seishi Ogawa, Atsushi Iwama, Keiyo Takubo
2. 発表標題 The Pbx1-G9a axis dysregulates lineage output of aged hematopoietic stem cells
3. 学会等名 第20回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinya Fujita, Takayuki Morikawa, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Nociceptive nerves facilitate hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow by regulating microcirculation
3. 学会等名 第20回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 反町優理子, 小林央, 合田亘人, 田久保圭誉
2. 発表標題 間葉系幹細胞特異的p53欠損は幹細胞特性を変化させて未分化軟部肉腫を発症する
3. 学会等名 癌と代謝研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田進也, 森川隆之, 片岡圭亮, 田久保圭誉
2. 発表標題 侵害受容神経は骨髄微小循環を制御し造血幹前駆細胞のホーミングを促す
3. 学会等名 低酸素研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 加齢造血幹細胞の「強さ」を支える代謝リプログラミング
3. 学会等名 実験動物中央研究所特別セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 骨髄環境のイメージング
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 神経伝達物質による造血幹細胞のホーミング制御
3. 学会等名 第4回血液疾患領域Web研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 侵害受容神経による造血幹・前駆細胞のホーミング制御
3. 学会等名 日本再生医療学会第3回科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林央, 田久保圭誉
2. 発表標題 骨髄の微小循環と造血幹細胞のエイジング
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田久保 圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞のATP濃度制御とエイジング
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綿貫慎太郎、小林央、田久保圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞のPFKFB3依存的解糖系流量調節
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綿貫慎太郎、小林央、田久保圭誉
2. 発表標題 PFKFB3はストレス毎に異なる修飾を介して造血幹細胞機能を維持する
3. 学会等名 低酸素研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綿貫慎太郎、小林央、杉浦悠毅、山本正道、城下郊平、反町優理子、小出周平、大島基彦、西山晃、村上紘一、原口美帆、玉置新平、山本雄広、岡本真一郎、田村智彦、末松誠、岩間厚志、田久保圭誉
2. 発表標題 Real-time ATP analysis reveals stress-dependent Pfkfb3 modification and its effect on hematopoiesis
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Fujita, Takayuki Morikawa, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Nociceptive nerves facilitate hematopoietic cell homing to bone marrow by tuning microcirculation
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Optimized culture condition that improves post-editing function of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Daiki Karigane, Keiyo Takubo
2. 発表標題 An optimized culture condition for hematopoietic stem cells that improves the gene editing efficiency and post-editing function
3. 学会等名 ISEH2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田久保圭誉
2. 発表標題 神経シグナルによる造血幹・前駆細胞のホーミング制御
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクト公式サイト https://takubolab.com/
--

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
---------	---------